

# PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

**ROBERT CHAMBERS**  
NEW YORK

**NOBURÔ KAMIYA**  
OSAKA

**SIEGFRIED STRUGGER**  
MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

**JOSEF SPEK**  
ROSTOCK

**FRIEDL WEBER**  
GRAZ

**KARL HÖFLER**  
WIEN

**BAND XLVII, HEFT 1—2**

MIT 83 TEXTABBILDUNGEN UND 6 FARBIGEN ABBILDUNGEN AUF 2 TAFELN  
ABGESCHLOSSEN AM 3. MAI 1956



**WIEN**  
**SPRINGER-VERLAG**  
1956

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einem berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut, Graz, Schubertstraße 51, Österreich, oder

Prof. Dr. J. Speck, Zoologisches Institut, (3a) Rostock, Universitätsplatz, DDR, oder

Prof. Dr. K. Höfler, Pflanzenphysiologisches Institut, Wien I, Dr.-Karl-Lueger-Ring 1, Österreich

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mäckerbastei 5

Fernsprecher: U 26-5-60 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfähig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Bezahler der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1½ Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostenerersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

XLVII. Band

Inhaltsverzeichnis

1.—2. Heft

Abhandlungen	Seite
Arndt, E. A.: Histologische und histochemische Untersuchungen über die Oogenese und bipolare Differenzierung von Süßwasser-Teleostern . . . . .	1
Wooßmann, H.: Die Fällungsmetachromasie der chromotropen Substanzen der Ciliaten und Flagellaten . . . . .	37
Jonas, H.: A Study of the Dynamics of K <sup>43</sup> uptake by Sunflower Plants with the Aid of a Scintillation Count-Rate Meter . . . . .	67
Alcer, G.: Die Aufnahme von Harnstoff und Glycerin durch die Pflanzenzelle in Abhängigkeit von der Acidität der Außenlösung und des Zellsaftes . . . . .	77
Schoaser, G.: Über die Regeneration bei den Cladophoraceen . . . . .	103
Turian, G.: Le corps paranucléaire des gamètes géants d' <i>Allomyces javanicus</i> traité à l'acide borique . . . . .	135
Keller, R.: Elektropolare Farbstoffe im elektrischen Organ . . . . .	139
Thielke, Charlotte: Gerbstoffidioblasten in der Scheide von <i>Carex</i> . . . . .	145
Badenhuizen, N. P., and R. W. Dutton: Growth of <sup>14</sup> C-labelled Starch Granules in Potato Tubers as Revealed by Autoradiographs . . . . .	156
Kaho, H.: Untersuchungen über die antagonistische Wirkung der Mono- und Disaccharide sowie der mehrwertigen Alkohole bei der Wirkung von Säuren auf das Pflanzenplasma II. Mitt. . . . .	164
Meß, Eva: Kritische Untersuchungen zur kolorimetrischen Bestimmung der isoelektrischen Punkte einzelner Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe . . . . .	189
Sinapius, D., and W. Schrell: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Cytoplasma des Aortenendothels . . . . .	217
Referate . . . . .	236



# Histologische und histochemische Untersuchungen über die Oogenese und bipolare Differenzierung von Süßwasser-Teleosteen

Von

**Ernst Albert Arndt**

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Rostock

Mit 12 Textabbildungen und 1 farbigen Tafel

(Eingegangen am 15. Mai 1955)

## Inhaltsverzeichnis

Einleitung . . . . .	1
Material und Technik . . . . .	4
a) Material . . . . .	4
b) Technik . . . . .	4
1. Fettfärbemethoden . . . . .	4
2. Untersuchung mit Kernfarbstoffen . . . . .	7
3. Andere Nachweise . . . . .	7
Eigene Untersuchungen . . . . .	8
Oocyten-Stadium I . . . . .	10
Oocyten-Stadium II . . . . .	12
Oocyten-Stadium III . . . . .	17
Oocyten-Stadium IV . . . . .	21
Untersuchungen am befruchteten Ei . . . . .	24
Diskussion der Ergebnisse . . . . .	28
Literatur . . . . .	34

## Einleitung

Die Vorgänge der Oogenese und bipolaren Differenzierung bei Teleosteen wurden von *Spek* (1933) eingehend untersucht. Mit Hilfe von Vitalfarbstoffen und Mikroinjektionen von Clark-Lubs-Indikatoren wies er nach, daß die bipolare Differenzierung der Eier auf einer polaren Sonderung in alkalische und saure Zellkolloide beruht, wie er es schon früher bei *Nereis*-Eiern beschrieben hatte (*Spek* 1930).

In ganz jungen Oocyten der Teleosteer reagiert die Hauptmasse des Protoplasmas ziemlich sauer (pH ca. 5,8), aber schon hier läßt sich eine zweite alkalische Phase nachweisen. Im Laufe des Oocytenwachstums treten zunächst massenhaft alkalische Zellkolloide auf, die in Kernnähe entstehen und an die Oberfläche der Oocyte wandern, wo sie eine breite periphere Schicht bilden. Aus den alkalischen Substanzen differenziert sich noch eine feste Kortikalschicht aus, die jetzt direkt unter der primären Oocytenmembran liegt. Auf Grund ihrer Teilchenanordnung erhält sie radiärstreifiges Aussehen. Die vielen sauren Dotterkörnchen werden zwischen Kern und alkalischer Rindenschicht eingelagert. Nach Abschluß der Dotterbildung zeigt die inzwischen stark herangewachsene und durch die vielen Einlagerungen undurchsichtig gewordene Oocyte einen streng konzentrischen Aufbau. Der Kern liegt zentral, um ihn herum eine breite Zone von sauren Dottersubstanzen, dann die alkalische Rindenschicht und schließlich unter der primären Oocytenmembran die radiärstreifige Kortikalschicht.

Kurz vor dem Ablaihen werden die Oocyten durch starke Verquellung der Zellsubstanzen glasklar. Der konzentrische Aufbau des Eies wird beim Hochwandern des Kerns zur Mikropyle verlassen. Es setzt eine bipolare Differenzierung ein in der Weise, daß die Hauptmenge der alkalischen Substanzen sich an dem Richtungskörperpol, die sauren Kolloide sich am gegenüberliegenden Pol anreichern. Geringe Mengen von alkalischen Kolloiden befinden sich noch an dem sauren Pol, wenige saure Substanzen sind auch am alkalischen Pol nachzuweisen. Es resultiert also bei der Differenzierung, die im Ovar angedeutet ist, ganz besonders schön aber erst nach dem Austreten des Eies in das Wasser in Erscheinung tritt, ein Konzentrationsgefälle, das für saure und alkalische Substanzen an entgegengesetzten Polen des Eies liegt. Am späteren animalen Pol konnte Speck ein pH von 7,6, am späteren vegetativen Pol ein solches von 5,6 feststellen.

Uns lag nun daran festzustellen, wie die histologischen und histochemischen Befunde mit diesen am lebenden Material erzielten Ergebnissen übereinstimmen.

Die histologischen Arbeiten über die Oogenese und Eireifung der Teleosteer sind leider ziemlich veraltet (His 1873, Oellacher 1872/73, Behrens 1898, Cunningham 1898 u. a.). Methodische Untersuchungen über die Vorstadien der Eireife fehlen fast vollkommen. Erst die Arbeiten Konopackas (1935, 1937) brachten neue Ergebnisse über die Histologie und Chemie der Dotterbildung. Ihre Ergebnisse, die sich allerdings vornehmlich auf marine Teleosteer beziehen, sollen im Laufe der Arbeit diskutiert werden.

Das Programm unserer Untersuchungen bestand darin, mit Hilfe histologischer und histochemischer Untersuchungsmethoden die von Speck erhaltenen Befunde während der Oogenese und bipolaren Differenzierung zu bestätigen und zu ergänzen. Zwei Stoffgruppen fanden in der vorliegenden Arbeit besondere Berücksichtigung.

Einmal befaßte ich mich mit der Verteilung der Lipide und deren Sonderung während der Oogenese, um eine Basis für Arbeiten über die

Lipidverteilung nach der Befruchtung bzw. während der Embryonalentwicklung der Teleosteer zu bekommen.

Spek (1942) war es gelungen, eine Methode zum Lipoidnachweis in der lebenden Zelle zu finden. Er beobachtete, daß einige Oxazinfarbstoffe — in besonders auffälliger Weise Irisblau — in lebenden Zellen bei Betrachtung im Dunkelfeld eine starke siegellackrote Fluoreszenz zeigen. Diese Erscheinung ist darauf zurückzuführen, daß die Fluoreszenz in Phosphatiden im Gegensatz zu den Eiweißen auch bei Gegenwart von Wasser auffällig verstärkt wird.

Die genauere Analyse der Fluoreszenz wurde mit dem Engelmannschen Mikrospektralphotometer durchgeführt. An einer langen Reihe von Modellsubstanzen konnte geklärt werden, für welche Art von Zellsubstanzen die starke Fluoreszenz zu beobachten ist, in welchen sie auch bei Gegenwart von Wasser erhalten bleibt und in welchen nicht. In reinen Fettsubstanzen (Neutralfette u. ä.) mit rein lipophilen Eigenschaften wird das Farbsalz von Irisblau gar nicht gelöst. In Eiweißkörpern und Kohlehydraten, die ja stark hydratisierbare Kolloide darstellen, tritt bei Gegenwart von Wasser praktisch keine Fluoreszenz auf. Die starke Fluoreszenz von Irisblau bleibt nur in wasserfreien Medien und in lipophilen Gruppen großer Moleküle erhalten. In erster Linie werden in Zellen nur die Phosphatide eine starke Fluoreszenz zeigen können, da sie hydro- und lipophile Gruppen in einer solchen räumlichen Anordnung besitzen, daß die starke Fluoreszenzsteigerung der Farbstoffteilchen in den wasserfreien Orten der Moleküle ermöglicht wird.

Spek benutzte schon (1943, unveröff.) diese Methode für Lipoidnachweise in den befruchteten Eiern und späteren Entwicklungsstadien der Regenbogenforellen (*Salmo irideus*). Sein Schüler Krammer (1950, Diss.) konnte an den Eiern des Hechtes (*Esox lucius*) die Ergebnisse noch vervollständigen.

Für Arbeiten, die an fixiertem Material mit den bekannten Lipidnachweisen die Ergebnisse Speks und Krammers untermauern sollen, wollte ich zunächst die Lipidverteilung in den Oocyten und frisch befruchteten Eiern genau klären.

Als zweite wichtige Stoffgruppe wurden die Kernsubstanzen eingehend untersucht. Bei Eizellen mit starker Dotterbildung sind in den verschiedensten Tiergruppen Besonderheiten im Verhalten des Kerns während der Oogenese festgestellt worden (Koch 1925, Ries 1932, Bauer 1937, Konopacka 1937). Besonders auffällig ist die ganz schwache Feulgen-Reaktion auf Thymonucleinsäure, die starke Vermehrung der Nucleolarsubstanz und in einigen Fällen das Austreten von Nucleolarsubstanz in das Cytoplasma der Eizelle. Caspersson (1936, 1940, 1941) konnte wahrscheinlich machen, daß das Chromatin das Zentrum der Eiweißsynthese darstellt. In wachsenden Oocyten und anderen embryonalen Zellen fand er im Cytoplasma eine große Menge von Ribonucleotiden, die vielleicht bei der Synthese von Eiweißdotterschollen aktiv mitwirken. Auch die vielen neuen Arbeiten über das Verhalten des Kerns während der Oogenese (z. B. Brachet 1952, Lepeschinskaja 1950, Glässer 1950, Chaudhry

1951, Gabeu. Prenant 1949, Pasteels 1948, Panijel u. Pasteels 1951) haben uns angeregt, diese Verhältnisse auch bei der Oogenese der Süßwasser-Teleosteer zu untersuchen.

## Material und Technik

### a) Material

Als Material für die Untersuchungen dienten verschiedene einheimische Süßwasserteleosteer (*Leuciscus rutilus*, *Cyprinus carpio*, *Esox lucius*, *Perca fluviatilis*, *Coregonus albula lucinensis*).

Da Plötze (*Leuciscus rutilus*) und Karpfen (*Cyprinus carpio*) zu jeder Jahreszeit beschafft werden konnten, wurden an ihnen vornehmlich die verschiedenen Wachstumsstadien der Oocyten 1. Ordnung untersucht.

In den Ovarien der Plötze findet man im Mai bis Juni nur ganz junge Oocyten, die noch keine Einlagerungen zeigen. Im Laufe des Sommers beginnt ein Teil der Oocyten heranzuwachsen. Es treten alkalische Granulen auf, und es bilden sich die ersten Dotterkörnchen. Diese Oocyten zeigen dann im Oktober und November eine radiärstreifige Kortikalschicht und sind durch die vielen Dottereinlagerungen vollkommen undurchsichtig geworden. Die nicht in das Wachstumsstadium eintretenden Oocyten verändern sich nicht. Sie bleiben glasklar und liegen neben den jetzt viel größeren undurchsichtigen Oocyten im Ovar. Bis zum Frühjahr treten keine größeren Veränderungen auf. Erst im März bis April zeigen die großen Oocyten noch einmal verstärkte Wachstumstendenz, und Ende April bis Anfang Mai werden sie aus dem Ovar als befruchtungsfähige Eier abgegeben.

Ganz ähnliche Verhältnisse finden wir in den Ovarien der Karpfen vor, nur daß hier durch die spätere Laichzeit (Mai bis Juli) eine jahreszeitliche Verschiebung eintritt.

Für die Untersuchungen über die bipolare Differenzierung und die Vorgänge während der Befruchtung eigneten sich besonders Fischarten, deren Eier man ohne Schwierigkeiten abstreifen und künstlich befruchten kann. Um verschiedene Laichperioden in einem Jahr auswerten zu können, wählten wir Hechte (*Esox lucius*), Laichzeit: März bis April, Barsche (*Perca fluviatilis*), Laichzeit: April bis Mai, und Maränen (*Coregonus albula lucinensis*), Laichzeit: November bis Dezember.

Die bei den Untersuchungen verwendeten Plötze und Barsche wurden in der Unter- und Oberwarnow gefangen. Die Karpfen wurden uns von der Karpfenzuchtanstalt Grönings bei Wismar, die Hechte von der Hechtbrutanstalt Sternberg i. M. und die Maränen von der Fischerei am Großen Stechlinsee bei Fürstenberg i. M. zur Verfügung gestellt.

Die Arbeiten wurden in den Jahren 1952 und 1953 durchgeführt.

### b) Technik

#### 1. Neutralfett- und Lipoidnachweise

Für die Lipidnachweise fixierten wir die Oocyten und befruchteten Eier in Formol. Das konzentrierte Formol (33%) wurde zur Neutralisierung der

Ameisensäure ständig über  $\text{CaCO}_3$  gehalten. Kurz vor der Fixation verdünnte ich 1 Teil Formol mit 3 Teilen Leitungswasser. Die Fixierungsdauer betrug gewöhnlich 6–48 Stunden. Wenn sich eine längere Fixierungsdauer nicht vermeiden ließ, so kamen die fixierten Objekte nach 24 Stunden in eine verdünnte Formollösung (1 T. 35%iges Formol + 9 T. Leitungswasser). Damit sollte verhindert werden, daß das Formol die Färbbarkeit der Lipide stark beeinflusste (s. H. Böhmighaus 1920, J. Specht 1923, N. Halliday 1939 u. a. m.).

Das fixierte Material wurde in den meisten Fällen mit dem Gefriermikrotom geschnitten. Nur bei dem Lecithinnachweis nach Romieu betete ich in Paraffin ein. Die Gefrierschnitte mußten sehr vorsichtig mit einer weiten Pipette vom Mikrotommesser genommen werden, da sonst der Eiinhalt unweigerlich herausfiel. Besonders empfindlich waren die ältesten Oocyten mit ihren vielen Einlagerungen. Hier gelangen uns immer nur wenige gute Schnitte von einem Ei, so daß auf die Herstellung von Schnittserien verzichtet werden mußte. Schnittdicken von 10 bis  $15\ \mu$  ergaben die besten Ergebnisse.

Auch bei dem Aufkleben der Schnitte auf Objektträger ergaben sich Schwierigkeiten. Destilliertes Wasser als Aufklebemittel bewährte sich nicht, da der Eiinhalt beim Trocknen stark schrumpfte. Erst als ich die entfetteten Objektträger mit einer Gelatineschicht überzog, erhielt ich bessere Resultate. Auf die Objektträger wurde mit dem Pinsel eine 3%ige Gelatinelösung aufgetragen, die noch 24 Stunden in einer 5%igen  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösung gehärtet wurde. Auf so vorbereiteten Objektträgern zeigten die Schnitte gute Haftbarkeit und keine Schrumpfungen des Eiinhalts. Diese Methode war schon (1951) von Flemming angewandt worden.

Bei den Paraffinschnitten (Romieu-Methode) verzichtete ich auf ein Aufkleben der Schnitte. Mit einer weiten Pipette wurden die Schnitte durch die verschiedenen Flüssigkeiten geführt und dann in Glycerin eingebettet.

Folgende histologische Neutralfett- und Lipoidfärbemethoden wurden angewandt:

Sudanorange nach Romeis (1929),

Nilblausulfat nach Lorrain-Smith in der Modifikation von Kleeberg (1925),

Methode von Smith-Dietrich (Dietrich 1910) für Phosphatide, Jodophile Reaktion von Romieu (1927) für Lecithine,

Cholesterinnachweis nach A. Schultze (nach Romeis 1932, § 872),

Plasmalreaktion nach Feulgen und Voit in der Modifikation von Verne (1929).

Für die Herstellung der Farblösungen und den genauen Behandlungsgang der Präparate verweisen wir auf die Originalarbeiten und auf Romeis (1932 und 1948).

Sudan III, Sudanorange und Sudanschwarz B sind bekanntlich keine eigentlichen Fettfarbstoffe und färben deshalb auch nicht. Die Sichtbarmachung der Lipide beruht auf einem reinen Lösungsphänomen. Der Lösungsvorgang ist vollkommen spezifisch für sämtliche Lipidsubstanzen (Kaufmann u. Lehmann 1926, Lison 1936, Cain 1950).



Eine Unterscheidung bestimmter Lipidsubstanzen gelingt mit ihnen nicht. Sudanorange löst sich in sämtlichen Lipiden leuchtend orange-gelb. Es werden im Gegensatz zu Sudan III auch die kleinsten Fetttropfchen dargestellt. Ein Herauslösen von Lipiden während der Behandlung ist durch die verwendete 40%ige alkoholische Lösung kaum zu befürchten.

Der Fettnachweis mit Nilblausulfat nach Lorrain-Smith soll rosa gefärbte Neutralfette (Triglyceride) und blau gefärbte andere Fettsubstanzen (z. B. in besonderem Maße Fettsäuren) unterscheiden. Nach Kaufmann und Lehmann (1926) ist nur die Rosafärbung der Neutralfette spezifisch. Bisher nahm man an, daß die Rosafärbung durch die stark fettlösliche Base des Nilblausulfats hervorgerufen wird. Nach Cain (1950) dagegen soll das Nilblausulfat aus einer Mischung von einem blauen Oxazinfarbstoff und einem Oxazon bestehen. Cain unterscheidet neutrale und saure Lipide. Zu den ersteren gehören Neutralfette und höhere Alkohole. Sie sind durch das Oxazon rosa gefärbt. Fettsäuren, Phosphatide und Cerebroside bezeichnet er als saure Lipide. Sie sind blau gefärbt.

Die Methode von Smith-Dietrich soll spezifisch Phosphatide, Cerebroside, Cholesterinfettsäuregemische, Fettsäuren und Seifen anfärben. Durch die Behandlung mit Kaliumbichromat werden die Lipoide oxydiert, das Chrom verbindet sich mit den Lipoiden, und das Hämatoxylin tritt dann mit dem Chrom zu einem schwarzen Farblack zusammen. Der gebildete Lack ist gegen Boraxferrixyankalium-Lösung unempfindlich, so daß man mit dieser schwach alkalischen und leicht oxydierend wirkenden Lösung das mechanisch umhergeschwemmte Hämatoxylin herauslösen kann. Nach Kaufmann und Lehmann ist nur eine tiefschwarze Färbung charakteristisch für Lipoide. Sie weisen darauf hin, daß der Ausfall der Färbungen von der bei der Färbung innegehaltenen Temperatur abhängig ist. Bei 60° C färbten sich Phosphatide, Cerebroside und Cholesterinester. Bei Cholesterinfettsäuregemischen und bei sämtlichen Fettsäuren war die Reaktion negativ. Lison (1936) bezeichnet die Smith-Dietrich-Methode als spezifisch für Lipoide (i. e. S.), wenn man die Anwesenheit von Cholesterinestern ausschalten kann. Negative Resultate lassen keinen Schluß zu. Cain (1950) lehnt allerdings die Smith-Dietrich-Methode als Nachweis für Phosphatide ab, da seiner Ansicht nach durch die Veränderungen der Färbung bei Anwesenheit von Eiweißen, Cholesterin oder Glycerin Irrtümer entstehen können. Ich habe bei meinen Färbungen eine Temperatur von 60° C innegehalten. Der Aufenthalt der Präparate in der Boraxferrixyankalium-Lösung wurde variiert, da ich bei zu langer Einwirkung der Lösung (12 Std.) Schädigungen des Farblackes beobachtete.

Die jodophile Reaktion von Romieu für Lecithine stellt einen mikrochemischen Nachweis für das Cholin im Lecithin dar. Nach vorangegangener Hydrolyse bildet sich bei Behandlung mit J-KJ-Lösung Jodcholin. Die lecithinhaltigen Regionen im Protoplasma zeigen mahagonirote bis violette Färbung. Die Anwendung der Hydrolyse schließt die Verwechslung mit Glykogen aus.

Dem Cholesterinnachweis nach A. Schultze liegt die

Liebermann-Burchardsche Cholesterinreaktion zugrunde. Die Probe mit Eisessig und konz.  $H_2SO_4$  fällt dann positiv aus, wenn das Cholesterin in Oxycholesterin verwandelt ist. Wir setzten die Schnitte mehrtägigem intensivem Tageslicht aus oder beizten die Schnitte mit 2½%-iger Eisenalaunlösung 24 Stunden. Kaufmann und Lehmann (1926) bezeichnen die Reaktion als spezifisch für Cholesterin. Ein negativer Ausfall beweist jedoch (besonders bei Anwesenheit von Glycerin, Phrenosin oder Kerasin) nicht die Abwesenheit von Cholesterin.

Die Plasmalreaktion nach Feulgen und Voit ist spezifisch für das Plasmal, das aus einem Gemisch von Aldehyden der Palmitin- und Stearinsäure besteht. Plasmal kommt nur in Verbindung mit Acetalphosphatiden in der Zelle vor und bildet mit diesen zusammen das sogenannte Plasmalogen. Durch Einwirkung von Sublimat oder Platinchlorid wird das Plasmal von den Acetalphosphatiden gespalten. Die freien Aldehyde der Palmitin- und Stearinsäure lagern dann fuchsinschweflige Säure an und werden dadurch rot gefärbt. Ich benutzte nach Verne (1929) 1%ige wäßrige Platinchloridlösung als Fixierungsmittel.

## 2. Untersuchung mit Kernfarbstoffen

Neben formolfixierten Gefrierschnitten untersuchte ich in der Hauptsache Material, das nach Carnoy oder Zenker fixiert und in Paraffin eingebettet war.

Gefärbt wurde mit folgenden Kernfarbstoffen:

Saures Hämalan nach P. Mayer  
Safranin-anilinlösung nach Babes  
Methylgrün nach Pappenheim  
Eisenhämatoxylin nach M. Heidenhain  
Gallocyanin-Chromalaun nach Becher  
Kernechtrot-Aluminiumsulfat  
Gallein-Aluminiumchlorid nach Becher  
Nuclealfärbung nach Feulgen.

Über die genauen Daten zu diesen Färbungen siehe Romeis (1950). Eine ausführliche Darstellung der Theorien der Kernfärbungen findet sich bei Zeiger (1938).

## 3. Andere Nachweise

Um einen Überblick über die anderen Hauptkomponenten der Eizelle zu bekommen, benutzte ich bei den Untersuchungen noch folgende Nachweise:

Eosin, wasserl.

Methylgrün-Pyronin

Xanthoproteinreaktion

zur Plasmafärbung

nach Unna zur Plasma- und Kernfärbung  
für Eiweiße mit aromatischen Kernen im Molekül (bes. Tryptophan). Daneben sind auch Phenole, Indolderivate und Alkaloide gefärbt

**Millonsche Reaktion nach****Bensley u. Gersh (1933)**

für Eiweißkörper mit aromatischen Kernen im Molekül (bes. Tyrosin), auch bei bestimmten Phenolen positiv

**Ninhydrinreaktion**

für niedrigere Eiweißkörper bzw. ihre Abbauprodukte

**Polysaccharidreaktion**nach **Bauer (1933)**

für Polysaccharide (Glykogen, Galaktogen, Stärke, Tunicin und Zellulose)

**Toluidinblau**

für metachromatische Substanzen

**Polychromes Methylenblau**nach **Unna**

für metachromatische Substanzen

Neben den Untersuchungen am fixierten Material führte ich ständig Vitalfärbungskontrollen durch. Es wurden die von **Spek (1933)** angewendeten Vitalfarbstoffe benutzt.

Die Photographien wurden mit einer Exacta-Varex hergestellt. Ich benutzte für die Mikroaufnahmen ein LgOE-Zeiß-Mikroskop mit einem Miflexaufsatzgerät. Die verwendeten Okulare und Objektive sind bei den einzelnen Abbildungen aufgeführt.

Die farbigen Abbildungen sind Schwarzweißphotographien, die mit Keilitz-Photographiefarben koloriert wurden.

### **Eigene Untersuchungen**

Um die Darstellung der Ergebnisse etwas übersichtlicher zu gestalten, habe ich die Entwicklung der Oocyten in verschiedene Stadien eingeteilt. Bei meinen Untersuchungen ergab sich, daß die verschiedenen Dottersubstanzen in den wachsenden Oocyten in einer bestimmten Reihenfolge nacheinander angelegt werden. Deshalb benutzte ich zur Charakterisierung der einzelnen Stadien neben der Morphologie vor allem die Anlage der Dottersubstanzen. Im einzelnen unterscheiden wir:

**Stadium I:** Junge Oocyten mit großem, zentral gelegenen, blasenförmigem Kern. Protoplasma ohne größere Einlagerungen (z. B. farbige Tafel, Bild 1).

**Stadium II:** Oocyten mit noch relativ großem Kern. Im Protoplasma erscheinen Rindenvakuolen und bilden eine breite periphere Schicht. Die Kortikalschichtbildung beginnt (z. B. farbige Tafel, Bild 2).

**Stadium III:** Nach den Rindenvakuolen erscheinen jetzt im perinuclearen Protoplasma Eiweiß-Lipoid-Dotterschollen, die sich in diesem Stadium stark vermehren. Die Rindenvakuolen werden dabei auf eine schmale periphere Zone gedrängt. Die Kortikalschicht erhält radiärstreifiges Aussehen und nimmt an Breite beträchtlich zu. Die Oocyte zeigt immer noch streng konzentrischen Bau (z. B. Abb. 8).

**Stadium IV:** Der Kern beginnt an die Peripherie der Oocyte zu wandern. Die Dotterkugeln zeigen Tendenz zur Fusion. Die Rindenvakuolen sind völlig verschwunden. Durch Verschmelzung vieler kleiner Tröpfchen bilden sich bei bestimmten Fischarten große „Ölkugeln“ aus. Sie bestehen

aus Neutralfetten und Lipoiden. Schließlich löst sich der Kern auf. Das feingranulierte Protoplasma sammelt sich vorwiegend am Pol, wohin der Kern gewandert ist. Der Dotter erscheint fast vollkommen homogen. Eventuell

Tabelle 1. (Größenangaben in  $\mu$ .)

		Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
<i>Leuciscus rutilus</i>	$\varnothing$ der Oocyten	60—220	200—350	400—1300	
	$\varnothing$ der Kerne	35—100	95—125	100—180	
	Jahresztl. Auftr.	z. jed. Jahreszt.	Juni—Sept.	Juli—Mai	
<i>Cyprinus carpio</i>	$\varnothing$ der Oocyten	35—150	160—250	230—1200	
	$\varnothing$ der Kerne	17—60	70—110	100—200	
	Jahresztl. Auftr.	z. jed. Jahreszt.	Juli—Sept.	August—Juli	
<i>Coregonus albula lucinensis</i>	$\varnothing$ der Oocyten				~ 1400
	$\varnothing$ der Kerne				~ 250
	Jahresztl. Auftr.				Anfang Dez.

vorhandene Lipoidtropfen oder Ölkugeln liegen zwischen der Keimscheibenanlage und dem übrigen Dotter.

Im wesentlichen stimmen die Ergebnisse bei *Cyprinus carpio* und *Leuciscus rutilus* miteinander überein, so daß ich auf eine getrennte Behandlung verzichtet habe.

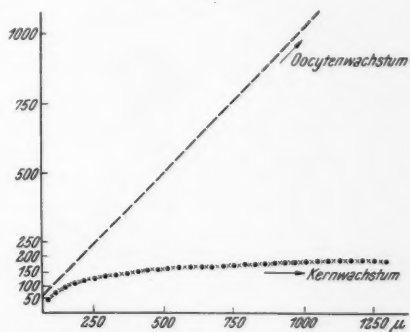
Besonderheiten der einzelnen Arten werde ich bei der Besprechung der Stadien erwähnen.

Die Tabelle 1 soll einen Überblick über die Größenverhältnisse zwischen den verschiedenen Stadien geben. Außerdem haben wir noch die Kerngrößen und das jahreszeitliche Auftreten der verschiedenen Stadien eingetragen.

Besonders das Verhältnis der Kerndurchmesser zu den Oocyten durchmessern verändert sich in den verschiedenen Wachstumsstadien ganz beträchtlich. Die graphische Darstellung soll dies noch deutlicher machen (s. Tabelle 2).

Auf der Ordinate sind die absoluten Größen in  $\mu$  angegeben. Auf der Abszisse ist das Wachstum der Oocyten (in  $\mu$ ) eingetragen.

Tabelle 2.



*Stadium I*

Die jungen Oocyten erscheinen im lebenden Zustand vollkommen glasklar durchsichtig. Sie besitzen einen sehr großen blasenförmigen Kern. Die Oocyten sind von einem einschichtigen, sehr flachen Follikelepithel umgeben.

Unsere Untersuchungen über die Lipidverteilung ergaben bei allen verwendeten Methoden übereinstimmende Ergebnisse.

Mit Sudanorange ist das gesamte Plasma orangerot gefärbt. Der Kern zeigt keine positive Reaktion.

Nilblaufärbung nach Lorrain-Smith ruft reinblaue Färbung des Plasmas hervor (s. farbige Tafel, Bild 1). Irgendwelche Anzeichen von rosa Farbtönen konnten nicht festgestellt werden.

Die nach Smith-Dietrich behandelten Schnitte zeigen tiefschwarze Färbung des Plasmas. Die Reaktion ist bei einer solchen lackschwarzen Färbung als positiv anzusehen.

Die jodophile Reaktion nach Romieu vervollständigt das Bild. Das Plasma ist tief mahagonirot tingiert, der Kern gelb gefärbt.

Der Cholesterinnachweis nach A. Schultze und die Plasmalogenreaktion verliefen trotz wiederholter Versuche negativ.

Nach dem, was ich schon im „Material und Technik“ über die Spezifität der Lipidnachweise ausführte, können wir den Schluß ziehen, daß im Plasma der jungen Oocyten Lipide vorhanden sind. Das wird bewiesen durch die orangerote Färbung des Plasmas in Sudanorange. Der positive Ausfall des Smith-Dietrich-Nachweises und der jodophilen Reaktion nach Romieu für Lecithine zeigt uns an, daß es sich bei den mit Sudan färbbaren Substanzen um Lipide handelt. Die Blaufärbung mit Nilblausulfat entspricht diesem Ergebnis. Da mit diesem Farbstoff keine Rosafärbungen auftraten, können wir das Vorhandensein von Neutralfetten mit einiger Sicherheit ausschließen.

Die Untersuchungen mit den Kernfarbstoffen zeigen deutlich, daß auch bei den Oocytenkernen der Süßwasserteleostee ähnliche Verhältnisse vorliegen, wie sie schon von vielen Autoren für Kerne anderer Eier mit starker Dotterbildung beschrieben worden sind.

Da die Färbungen mit saurem Hämalaun, Safranin, Anilinwasser, Methylgrün, Eisenhämatoxylin, Gallocyanin, Kernechtrot und Gallein weitgehend einander entsprechen, will ich, um unnötige Wiederholungen zu vermeiden, nur das Färbungsergebnis mit saurem Hämalaun genauer beschreiben.

Der Kern der jungen Oocyten ist bis auf zahlreiche Nucleolen ungefärbt. Die Nucleolen, die blau tingiert sind, liegen randständig unter der in diesem Stadium noch glatten Kernmembran. Das Plasma ist vollkommen gleichmäßig tiefblau angefärbt (Abb. 1). In dem sehr flachen Follikelepithel zeigen nur die Kerne Blaufärbung (Abb. 2). Dieses Ergebnis muß auf alle oben erwähnten Farbstoffe entsprechend übertragen werden. Immer sind im Kern nur die Nucleolen gefärbt, während das Plasma sehr stark den Farbstoff bindet. Schon in diesem frühen Stadium tritt ein deutlicher Unterschied in der Färbbarkeit des Plasmas zwischen formolfixierten Gefrier-



geschnitten und Zenker- oder Carnoy-fixierten Paraffinschnitten auf (vgl. Abb. 1 u. 2). Dasselbe Phänomen zeigt sich auch bei den anderen Stadien und wird noch näher erläutert werden (s. S. 32).

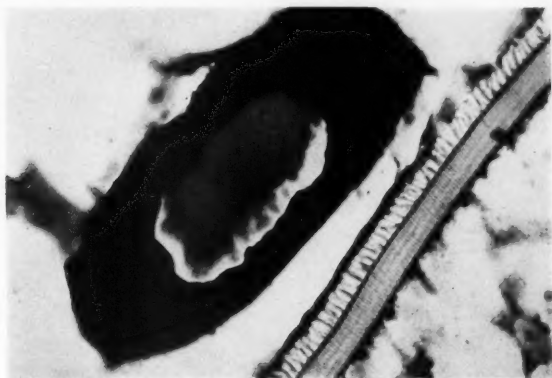


Abb. 1. Oocyte im Stadium I von *Leuciscus rutilus*. Formol, Gefrierschnitt, Hämalaun. Obj. 40, Ok. 7.

In den Ovarien der von mir untersuchten Karpfen (*Cyprinus carpio*) fand ich noch jüngere Stadien von Oocyten (Durchmesser der Oocyte:  $\sim 30 \mu$ , des Kerns:  $\sim 12 \mu$ ), die mir ermöglichten, etwas über die Entstehung

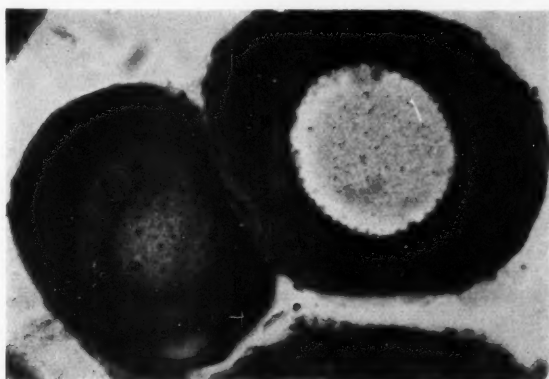


Abb. 2. Oocyten im Stadium I von *Leuciscus rutilus*. Zenker, Paraffinschnitt, Hämalaun. Obj. 40, Ok. 7.

der Oocyten vom Stadium I auszusagen. Die Anfärbungen mit Kernfarbstoffen ergaben, daß bei ihnen im Kern noch wesentlich mehr färbbare Substanzen liegen als bei den Oocyten des Stadiums I. Die Nucleolen sind zahlreich. Das Plasma ist in der Regel ungefärbt. Bei einigen Oocyten zeigt

das Plasma jedoch einen stark färbbaren perinuclearen Bezirk. Es scheint so, daß aus dem Kern färbbare Substanzen auswandern, da mit dem Auftreten dieser perinuclearen Zone die Färbbarkeit des Kernes nachläßt. Allmählich wird das gesamte Plasma stark tingierbar, während der Kern am Ende nur noch die Nucleolen als färbbare Substanzen enthält. Es sind also die Oocyten von Stadium I entstanden.

Aus den mit Kernfarbstoffen erzielten Anfärbungen ergibt sich, daß das Plasma der jungen Oocyten und die Nucleolen im Kern stark basophil sind. Dabei verstehe ich unter der Basophilie nur die Fähigkeit von Zellsubstanzen, im fixierten Zustand basische Farbstoffe stark anzulagern.

Die Feulgen-Reaktion auf Thymonucleinsäure fällt ohne Ausnahme im Kern und Plasma dieser jungen Oocyten negativ aus. Nur die Kerne der Follikelepithelzellen erscheinen schön violett gefärbt. Mit der Methylgrün-Pyronin-Methode erhält man rot gefärbtes Plasma, sehr schwach rot gefärbte Nucleolen und einen ungefärbten Kern. Auch hier sind nur die Kerne der Follikelepithelzellen grün gefärbt. Zum anderen ergibt der saure Farbstoff Eosin homogene Rotfärbung des Kernes und des Plasmas. Daraus ersieht man, daß die Substanzen im Plasma nicht nur basophil, sondern auch oxyphil reagieren, während der Kern in diesem Stadium bis auf die Nucleolen nur oxyphile Substanzen enthält. Dabei ist besonders zu betonen, daß der Kern keinerlei auffällige Strukturen erkennen läßt.

Da ich bei den späteren Wachstumsstadien ähnliche Verhältnisse vorfand, wollen wir die Ergebnisse am Schluß im Zusammenhang diskutieren.

Mit den übrigen Nachweisen ergaben sich keine bedeutenden Befunde. Mit Millons Reagens war das Plasma schwach rosa gefärbt. Ninhydrin- und Xanthoprotein-Reaktion fielen negativ aus. Auch die Polysaccharidreaktion nach Bauer konnte keinen Nachweis von irgendwelchen Polysacchariden erbringen. Sämtliche behandelten Schnitte blieben ungefärbt. Mit Toluidinblau und polychromem Methylenblau waren Nucleolen und Plasma im orthochromatischen Farbton tingiert. Metachromatische Farbtöne zeigten sich nicht.

### *Stadium II*

Die jungen Oocyten wachsen heran und bilden als erste gröbere Einlagerungen in der Nähe der Oocytenmembran Vakuolen aus. Manche Autoren bezeichnen sie wie Konopacka (1955) als „gouttes claires“. Ich möchte sie als Rindenvakuolen bezeichnen, da sie in der Nähe der Oocytenmembran entstehen und wahrscheinlich am Aufbau der Kortikalschicht beteiligt sind. Diese Rindenvakuolen liegen zunächst in einer Reihe unter der Oocytenmembran, vermehren sich dann aber stark und füllen am Ende des Stadiums II den größten Teil des Raumes zwischen Oocytenmembran und Kern aus (s. Abb. 6). Sie zeigen eine Struktur, die durch Lichtbrechungsunterschiede der einzelnen Bestandteile deutlich wird. In einer großen Vakuole liegt eine kleinere, an deren Peripherie eine Anzahl noch kleinerer, besonders stark lichtbrechender Vakuolen angeordnet sind (s. Abb. 10 und 11).

Die Hauptmasse des Plasmas ist auf den Raum um den Kern beschränkt.

Unter der Oocytenmembran und zwischen den einzelnen Rindenvakuolen ist es nur noch in geringer Menge vorhanden.

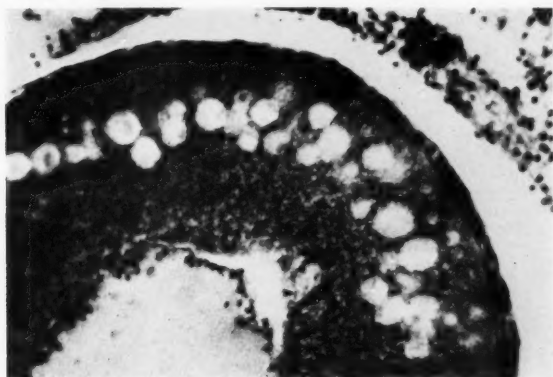


Abb. 3. Oocyte im Stadium II von *Leuciscus rutilus*. Zenker, Paraffinschnitt, Kernechtrot. Obj. 40, Ok. 7.

Gleichzeitig mit der Ausbildung der Rindenvakuolen beginnt die Kernmembran ihr Aussehen zu verändern. Es bilden sich Ausbuchtungen in das Plasma hinein, meistens an den Stellen, wo die Nucleolen der Kernmembran

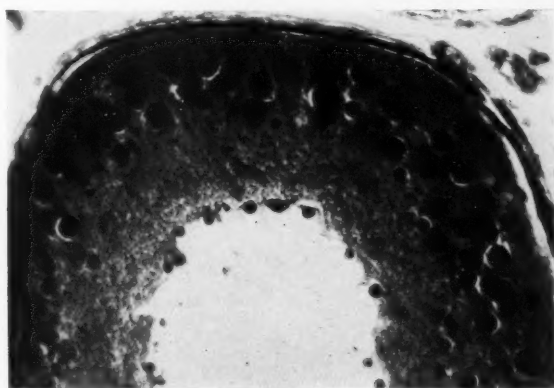


Abb. 4. Oocyte im Stadium II von *Cyprinus carpio*. Zenker, Paraffinschnitt, Gallein. Obj. 20, Ok. 6,3 proj.

anliegen. Ich werte dies als deutliches Zeichen für die Aktivität des Kerns bei der Dotterbildung.

Nachdem eine Reihe von Rindenvakuolen gebildet ist, beginnt die Anlage der Kortikalschicht, d. h. unter der primären Oocytenmembran werden Substanzen aus der Oocyte angelagert. Die Kortikalschichtbildung setzt

beim Karpfen etwas früher als bei der Plötze ein. Zunächst ist in dieser Schicht keine Radiärstreifung zu erkennen.

Mit Beginn des Stadiums II wird das Follikelepithel zweischichtig. Die Zellen, die der Oocytenmembran aufliegen, sind fast kubisch, während die darüberliegende Schicht aus flachen Zellen besteht (s. Abb. 3).

Die Untersuchungen über die Lipidverteilung ergeben keine großen Unterschiede zu denen des Stadiums I. Die mit Sudanorange färbaren Lipide (s. Abb. 5) sind im gesamten Plasma aufzufinden. Ihre Lipoidnatur wird wiederum durch positive Smith-Dietrich-Reaktion, positive jodophile Reaktion nach Romieu und durch Blaufärbung mit

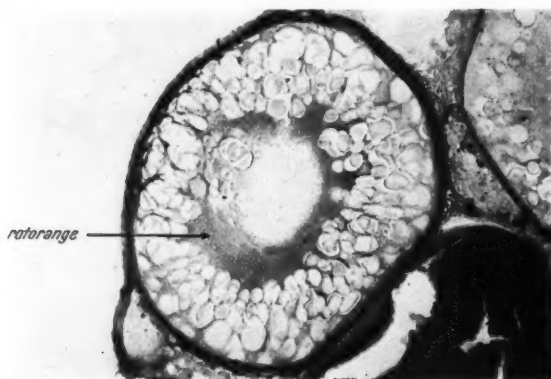


Abb. 5. Oocyte im Stadium II von *Leuciscus rutilus*. Formol, Gefrierschnitt, Sudanorange. Obj. 8, Ok. 6,3 proj.

Nilblausulfat nach Lorrain-Smith bewiesen. Triglyceride, d. h. Neutralfette, erscheinen in diesem Stadium noch nicht. Die Rindenakuolen und die hier noch sehr dünne Kortikalschicht sind stets ungefärbt.

Mit den Kernfarbstoffen sind wie im Stadium I das Plasma und die Nucleolen gefärbt. Dabei konnte ich feststellen, daß die Stärke der Plasmafärbung abhängt von der Art der Fixierung und der Einbettung des Materials. Nach Zenker oder Carnoy fixierte und in Paraffin eingebettete Oocyten lassen deutlich eine Abnahme der basophilen Substanz im Plasma erkennen. Bei Oocyten, die mit Formol fixiert und mit dem Gefriermikrotom geschnitten sind, ist das Plasma wesentlich stärker gefärbt. Dieses Phänomen tritt im Stadium III noch viel auffälliger in Erscheinung.

Der Kern enthält nur die Nucleolen als gefärbte Bestandteile. Die Nucleolen sind besonders schön gefärbt nach Zenker-Fixierung. Sie liegen größtenteils in den Ausbuchtungen, die die Kernmembran gebildet hat, und zeigen bei Zenker- und Carnoy-Fixierung im Innern Vakuolen, die vielfach randständig angeordnet sind (s. Abb. 12). Ob es sich dabei um Fixierungsartefakte handelt, ist nicht zu entscheiden. Jedenfalls

find ich diese Struktur der Nucleolen auch bei späteren Stadien in gleicher Weise wieder.

Während die Anfärbungen des Plasmas und der Nucleolen mit allen verwendeten Kernfarbstoffen übereinstimmen, verhalten sich die Rindenvakuolen den Kernfarbstoffen gegenüber verschieden. Mit saurem Hämalaun, Kernechtrot, Galloeyanin, Eisenhämatoxylin, Safranin und Methylgrün erhielt ich gar keine oder nur sehr schwache Anfärbungen. Auffällig anders verhielt sich Gallein. Mit diesem Farbstoff waren neben dem Plasma und den Nucleolen auch die Rindenvakuolen und die Kortikalschicht außerordentlich stark angefärbt (s. Abb. 4). Ich konnte

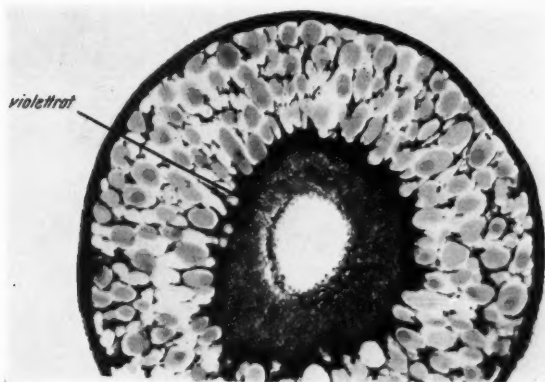


Abb. 6. Oocyte im Stadium II von *Leuciscus rutilus*. Formol, Gefrierschnitt, Kernechtrot. Obj. 8, Ok. 6,3 proj.

außerdem beobachten, daß die der Oocytenmembran am nächsten gelegenen Rindenvakuolen z. T. ihre Konturen verlieren und sich im Plasma auflösen. Da die Kortikalschicht ebenso stark gefärbt ist wie die Rindenvakuolen, liegt der Gedanke nahe, daß aus diesen Vakuolen die Kortikalschicht entsteht. Daß diese Anfärbungen auf typische basophile Substanzen in den Rindenvakuolen und der Kortikalschicht hinweisen, ist sehr unwahrscheinlich. Dann hätten doch wenigstens ein paar der anderen Kernfarbstoffe ähnliche Ergebnisse zeigen müssen. Viel wahrscheinlicher ist es, daß es sich hier um Stoffe handelt, die Ähnlichkeiten im chemischen Aufbau mit den außer dem Kern mit Gallein färbbaren Substanzen aufweisen, nämlich Kittlinien, Knochenzellen und elastische Fasern. Alle diese genannten Substanzen enthalten neben Skleroproteinen Mucopolysaccharide. Diese sind in vielen tierischen Zellen als Membranbildner nachgewiesen.

Auch die Polysaccharidreaktion nach Bauer und die Anfärbung mit metachromatischen Farbstoffen deuten auf das Vorhandensein von Mucopolysacchariden in den Rindenvakuolen hin. Mit der Bauer-Reaktion erhielt ich Rosafärbung in den Vakuolen und sehr schwache Diffusfärbung des



Plasmas. Da nach vorheriger Behandlung mit Speichel keine Veränderung des Färbungsbildes eintrat, kann es sich bei den Substanzen nicht um Glykogen handeln.

Toluidinblau und polychromes Methylenblau ergaben schöne metachromatische Anfärbungen der Rindenvakuolen, was zu der Annahme berechtigt, daß Mucopolysaccharide vorhanden sind.

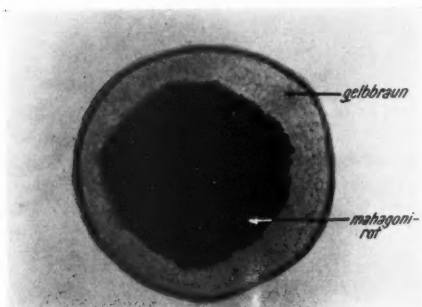


Abb. 7. Oocyte im Stadium III von *Leuciscus rutilus*. Formol. Paraffinschnitt, jodophile Reaktion nach Romieu. Obj. 8, Ok. 7.

Mit den von Spek ausgearbeiteten Methoden zur Unterscheidung von metachromatischen Farbänderungen und Umschlägen von Indikatoren durch Veränderung des pH wurde der Inhalt der Rindenvakuolen noch nicht untersucht, da dies vom ursprünglichen Thema etwas zu sehr abgeführt hätte. Diese Untersuchung soll erst in einer späteren Arbeit erfolgen. Fast alle wäßrigen Vakuolen nichtdrüsiger

tierischer Zellen enthalten einen alkalischen Inhalt. Andererseits scheiden sich auch Mucopolysaccharide gerne in wäßrige Vakuolen aus, so daß u. U. beides vorliegen könnte, ein chromotroper Stoff und eine alkalische Reaktion.

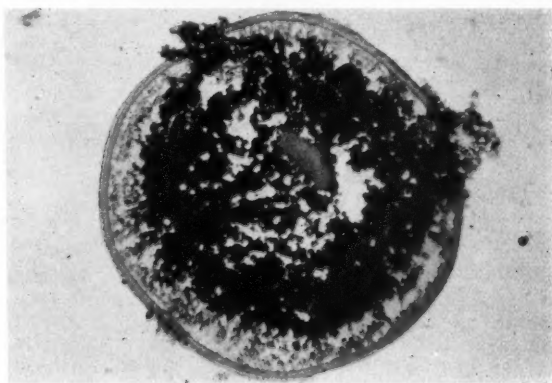


Abb. 8. Oocyte im Stadium III von *Leuciscus rutilus*. Formol, Gefrierschnitt, Hämalaun. Obj. 3, Ok. 10.

Einen Nachweis muß ich in Verbindung mit den Rindenvakuolen noch besonders erwähnen. Millons Reagens zeigt eine Anfärbung der Rindenvakuolen und der Kortikalschicht neben einer sehr schwachen Plasma-diffusfärbung. Wie schon bei der Galleinfärbung wird deutlich, daß sich

die Rindenvakuolen auflösen und wahrscheinlich in die Kortikalschicht übertreten. Der Nachweis zeigt, daß in Kortikalschicht und Rindenvakuolen eine Eiweißkomponente vorhanden sein muß, die Tryptophan als Baustein enthält.

### Stadium III

Das Stadium III ist durch besonders starke Dotterbildung ausgezeichnet. In diesem Stadium werden alle noch fehlenden Dottersubstanzen gebildet, da mit Abschluß des Stadiums die Dotterbildung beendet ist.

Bei den Plötzen beginnt dieses wichtige Stadium mit der Bildung von ersten Dotterschollen in dem perinuclearen Grundplasma. In dieser Zeit

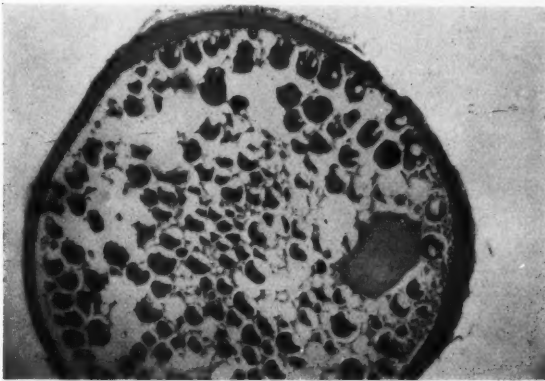


Abb. 9. Oocyte im Stadium IV (Anfangsstadium) von *Coregonus albula lucinensis*. Carnoy, Paraffinschnitt, Hämalaun. Obj. 3, Ok. 6,5 proj.

erfüllen noch die Rindenvakuolen den Hauptteil der Oocyten. Mit zunehmender Stärke der Dottertropfenschicht nehmen die Rindenvakuolen ab. Gleichzeitig wächst die Kortikalschicht heran und zeigt bald die typische radiärstreifige Struktur. Die Vermehrung der Dotterschollen geht so weit, daß am Ende des Stadiums III fast die gesamte Oocyte von Dottermaterial erfüllt ist. Die Rindenvakuolen sind auf eine ganz schmale Zone unter der stark herangewachsenen Kortikalschicht beschränkt (s. farbige Taf., Bild 3, und Abb. 8).

Bei den Eiern des Karpfens verläuft die Bildung der Dottergranula insofern anders, als die ersten Dottertropfen nicht perinuclear, sondern zwischen den peripher liegenden Rindenvakuolen auftreten. Die Zahl der Rindenvakuolen nimmt außerdem beim Karpfen während der ersten Dotterschollenbildung noch zu. Erst nachdem größere Mengen von Dottergranulen gebildet sind, tritt der gleiche Vorgang wie bei den Eiern der Plötze ein, die Rindenvakuolen werden an die Peripherie gedrängt, lösen sich z. T. auf, und die Kortikalschicht nimmt an Breite stark zu. Im Stadium III tritt von außen um die Kortikalschicht herum eine weitere Hüllbildung auf. Besonders schön ist sie bei *Leuciscus* ausgebildet (s. Abb. 10). Ich konnte im Rahmen meiner Arbeit nicht näher auf ihre Entstehungsweise eingehen.

Von den älteren Autoren wird sie auf Grund ihres Aussehens als Zottenschicht bezeichnet. His nennt diese Bildung Eikapsel und deutet sie als akzessorische Eihülle chorionalen Ursprungs.

Während dieser umfangreichen Dotterbildungen vergrößert sich der Kern nur sehr wenig (s. Tab. 1 und 2). Die schon im Stadium II beschriebenen Ausbuchtungen der Kernmembran werden so weit ausgebildet, daß die Membran zottig erscheint. Die Nucleolen sind größer geworden und liegen fast ausschließlich in den kleinen Ausbuchtungen (s. Abb. 12).



Abb. 10. Oocyte im Stadium III von *Leuciscus rutilus*. Formol, Gefrierschnitt, Hämalan, Obj. 40, Ok. 6,3 proj.

Besonders betonen möchte ich noch, daß die Oocyte auch in diesem Stadium ihren streng konzentrischen Aufbau bewahrt.

Mit den Neutralfett- und Lipoid-Färbemethoden ergab sich folgendes Bild: Sudanorange färbte das Grundplasma und die Dotterschollen intensiv orangefarben. Kern, Rindenvakuolen und Kortikalschicht blieben ungefärbt. Mit der Smith-Dietrich-Methode erhielt ich intensive Schwarzfärbung der gesamten Dotterzone einschließlich des Grundplasmas. Der Kern, die Rindenvakuolen und die Kortikalschicht blieben auch bei diesem Nachweis ungefärbt. Sehr schöne Bilder erhielt ich mit der jodophilen Reaktion nach Romieu (s. Abb. 7). Alle Dotterschollen und das Grundplasma waren tiefmahagonirot gefärbt.

Wir können aus dem Ausfall der Färbungen den Schluß ziehen, daß bei den Oocyten des Stadiums III neben dem Plasma auch die neu auftretenden Dotterschollen Lipide enthalten müssen. Dasselbe Ergebnis erhielt Flemming (1951), der an der Plötze dieses Oocytenstadium auf seinen Lipidgehalt untersuchte. Da die Romieu-Methode stark positiv ausfällt, nehme ich an, daß die Dotterschollen als Lipoidkomponente vor allem Lecithin enthalten. Mit Nilblausulfat nach Lorrain-Smith erhielt ich nach vorgeschriebenem Behandlungsverlauf Blaufärbung des Plasmas und der Dotterschollen. Dies bestätigt das Vorkommen von Lipoiden. Verwendete ich aber als Differenzierungsmittel statt der 1%igen Essigsäure 2%ige und verlängerte ich die Differenzierungszeit auf etwa 30–40 Min., so verschwand der blaue Farbton nach und nach, und ich konnte deutlich eine schwache Rosafärbung der Dotterschollen wahrnehmen. In den nicht so stark differenzierten Schnitten scheint der kräftig blaue Farbton die Rosa-

färbung zu überdecken. Die Rosafärbung tritt erst bei Oocyten auf, die schon sehr viele Dottersubstanzen gebildet haben. Es müssen also im Stadium III neben der großen Menge an Lipoiden auch Neutralfette angelegt werden.

Plasmas- und Cholesterinreaktion verliefen auch in diesem Stadium negativ.

In diesem Zusammenhang wollen wir gleich die Nachweise besprechen, die uns weitere Hinweise für den chemischen Aufbau der Dotterschollen bringen. Mit Millon's Reagens ist einwandfrei nachzuweisen, daß neben den Lipoiden auch Eiweiße in den Dotterschollen vorhanden sein müssen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß es sich dabei um Phosphoproteide handelt. Zu den Phosphoproteiden gehören das Ovovitellin des Hühnereies

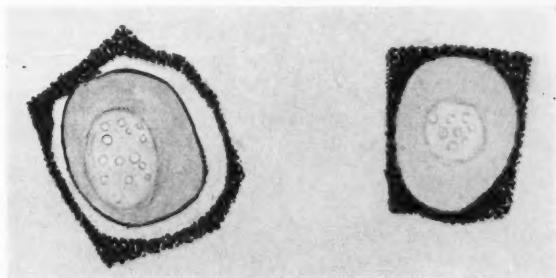


Abb. 11. Rindenvakuolen in den Oocyten von *Leuciscus rutilus* (Stadium II). Formol, Gefrierschnitt, saures Hämalaun. Obj. H-Immersion (90), Ok. 15 K.

und das Ichthulin der Fischeier, die demnach Phosphorsäure als prosthetische Gruppe enthalten und dadurch stark sauer reagieren.

Daß in den Dotterschollen Substanzen mit großer Acidität vorhanden sein müssen, zeigen die Untersuchungen mit den basischen Kernfarbstoffen. Mit saurem Hämalaun z. B. sind die Dotterschollen stark blauviolett angefärbt. Diese Färbung tritt aber nur an formolfixierten Gefrierschnitten auf. In mit Zenker- oder Carnoy-fixierten Paraffinschnitten kann man mit Methylgrün, saurem Hämalaun, Gallocyanin und Kernechtrot keine Anfärbung der Dotterschollen erreichen. Ich nehme an, daß durch die Zenker- oder Carnoy-Fixierung, vielleicht auch durch die Alkoholbehandlung, die prosthetische Gruppe des Phosphoproteids, also die Phosphorsäure, abgespalten wird, in Lösung geht und dadurch keine Anfärbungen mit den basischen Kernfarbstoffen eintreten können.

Eine Abnahme in der Färbbarkeit mit Kernfarbstoffen nach Zenker-Fixierung und Paraffineinbettung erwähnte ich schon beim Stadium I und II. Da noch keine Dotterschollen ausgebildet sind, nehmen wir an, daß im Stadium I und II geringe Mengen von Phosphoproteiden diffus verteilt im Grundplasma vorliegen, die dann durch die Zenker-Fixierung und Paraffineinbettung gespalten werden. Daraus ergeben sich aber für alle Färbungen des Plasmas mit Kernfarbstoffen

wichtige Konsequenzen. Wir müssen stets unterscheiden zwischen Anfärbungen, die bei formolfixierten Gefrierschnitten auftreten, und solchen, die auch nach Zenker-Fixierung und Paraffineinbettung erhalten bleiben. Ich werde bei der Diskussion der Ergebnisse diesen Fragenkomplex eingehend behandeln.

Allgemein ist über die Untersuchungen mit Kernfarbstoffen noch folgendes nachzutragen: In Paraffin- und Gefrierschnitten sind die Nucleolen mit allen benutzten Farbstoffen kräftig gefärbt. Ihre Struktur entspricht der des Stadiums II (s. Abb. 12) (s. S. 14). Das Grundplasma hat in Paraffinschnitten gegenüber den früheren Stadien stark an Färbbarkeit eingebüßt. Die Rindenvakuolen und die Kortikalschicht sind nur mit Gallein stark färbbar.

Eosin färbt den Kern bis auf die Nucleolen rot, das Grundplasma schwach gelbrot. Die Dotterschollen sind in Paraffinschnitten ungefärbt. Der Kern ist also immer noch oxyphil, während sich die Nucleolen rein basophil verhalten.



Abb. 12. Nucleolen in dem Kern einer Oocyte von *Cyprinus carpio* (Stadium III). Zenker, Paraffinschnitt, Hämalaun. Obj. H-Immersion (90), Ok. 15 K.

Die Feulgen-Reaktion verläuft auch bei den Oocyten des Stadiums III völlig negativ. Wieder sind nur die Kerne der Follikelepithelzellen angefärbt.

Die übrigen Nachweise bieten nicht viel Neues. Mit der Bauerschen Polysaccharid-Reaktion sind wie im Stadium II die Rindenvakuolen und das Grundplasma schwach diffus angefärbt. Speichelreaktion veränderte das Bild nicht.

Da mit dem Stadium III die eigentliche Dotterbildung abgeschlossen ist, d. h. in den folgenden Stadien im wesentlichen keine Neubildungen von Substanzen zu beobachten sind, wollen wir noch einmal kurz das Ergebnis unserer Untersuchungen zusammenfassen.

Im Stadium III ist der Kern mit seiner stark gelappten Membran oxyphil, die Nucleolen stark basophil. Im Grundplasma, das nach Zenker-Fixierung und Paraffineinbettung mit Kernfarbstoffen nur noch schwach färbbar ist, liegen die Dotterschollen eingebettet. In den Dotterschollen können wir saure Eiweiße (wahrscheinlich Phosphoproteide) und Lipide (vor allem Lecithin) nachweisen. Außerdem enthalten die Dotterschollen geringe Mengen von Neutralfetten. Ob neben den von mir nachgewiesenen freien Lipiden noch Lecithin vorkommt, das mit den sauren Eiweißen „symplexartig“ verbunden ist, so daß wir sogenannte Lipoproteide vor uns hätten, ist mit unseren Untersuchungsmethoden nicht zu entscheiden. In einer schmalen peripheren Zone — eingebettet im Grundplasma — liegen die Rindenvakuolen, die als eine Hauptkomponente wohl Mucopolysaccharide enthalten. Direkt unter der primären Oocytenmembran liegt die breite radiärstreifige Kortikalschicht.



#### Stadium IV

Für die Untersuchungen des Stadiums IV wurden neben Hecht- und Barscheiern vor allem Maräneneier (*Coregonus albula lucinensis*) verwendet. Die Art *Coregonus albula*, die als kleine Maräne bezeichnet wird und in tiefen Seen Norddeutschlands vorkommt, wird in zwei Unterarten eingeteilt. Ich habe vornehmlich die Unterart *Coregonus albula lucinensis* untersucht, deren Eier etwas größer als die von *Coregonus albula typica* sind. *Coregonus albula lucinensis* kommt nach B a u c h (1953) nur im Lucin- und Stechlinsee (Mecklenburg) vor. Die einzelnen Ergebnisse bei dieser Fischart können wir zwar nicht ohne weiteres verallgemeinern, doch ist anzunehmen, daß die bipolare Differenzierung in den wesentlichen Punkten bei allen Teleosteern übereinstimmend verläuft. Dies zeigten besonders die Untersuchungen von S p e k (1933).

Die Maränen erwiesen sich für die Untersuchungen dieses Stadiums besonders geeignet. Die Tiere laichen im November bis Dezember bei einer Wassertemperatur von 5 bis 6° C. Durch die niedrige Wassertemperatur verlaufen die Vorgänge im Ovarium sehr langsam, so daß die Umbildung vom Stadium III zum befruchtungsfähigen Ei etwa 24–48 Stunden in Anspruch nimmt. Bei allen anderen von mir untersuchten Fischarten dagegen geht diese Entwicklung so schnell vor sich (1 Std. oder noch weniger), daß man in den wenigsten Fällen die Übergänge fixieren kann.

Im Stadium IV tritt keine Neubildung von Substanzen mehr ein, charakteristisch ist allein ihre Umgruppierung. Die radiärstreifige Kortikalschicht ist noch stärker als im Stadium III ausgebildet. Die schmale Schicht der Rindenvakuolen ist gänzlich verschwunden. Das Grundplasma ist in der Nähe des Kerns und unter der Kortikalschicht etwas stärker angereichert. Im übrigen umhüllt es in zarter Schicht die einzelnen Dotterschollen und die bei der Maräne schon im Stadium III gebildeten Neutralfett- und Lipoidtröpfchen. Nachdem dieser Zustand erreicht ist, beginnt der Kern an die Peripherie der Oocyte zu wandern. Gleichzeitig der Auftakt zur ersten Reifeteilung und zur bipolaren Differenzierung!

Während der Kern seinen Weg an die Peripherie zum späteren Richtungskörperpol nimmt (Abb. 9) und sich dort schließlich auflöst, verändert auch das Grundplasma seine Lage. Alle Plasmabestandteile, die noch um die einzelnen Dotterschollen herumlagen, begeben sich an den Richtungskörperpol. Auch ein Teil des unter der Kortikalschicht angereicherten peripheren Plasmas, das S p e k als alkalische Rindenschicht bezeichnet hat, wandert an der Oberfläche zum Richtungskörperpol, so daß sich bei der Maräne am Ende eine breite Kuppe von Grundplasma ansammelt, die nach der Befruchtung zur Keimscheibe konzentriert wird.

Die alkalische Rindenschicht geht aber nicht vollständig in die Keimscheibenanlage über. Selbst im befruchteten Ei umhüllt sie noch als dünne Rindenschicht die gesamten Dottersubstanzen. Sie wurde früher fälschlicherweise als Dotterhaut bezeichnet.

Bei den Maräneneiern kann man schon mit bloßem Auge eine Wanderung von Zellsubstanzen zum Richtungskörperpol erkennen. Im Stadium III

haben sich bei den Maränen Fettsubstanzen aus den Lipoid-Eiweiß-Dotterschollen als winzige Gebilde herausgelöst, die dann allmählich an Umfang zugenommen haben. Die so gebildeten Fetttropfen liegen zunächst in der peripheren Zone der Dotterschollenschicht regelmäßig verteilt. Wenn der Kern die Oberfläche erreicht hat und das Plasma zu wandern beginnt, bewegen sich auch die Fetttropfen auf den Richtungskörperpol zu und sammeln sich unter der Keimscheibenanlage. Offensichtlich wandert das Grundplasma wesentlich schneller in die Keimscheibenanlage, so daß die Fetttropfen nur noch unter ihr Platz haben. Diese Anhäufung der Fetttropfen unter der Keimscheibe entspricht dem „disque huileux“ nach Lereboullet. (Die vielen kleinen Fetttropfen, die im Stadium III auftreten, lagern sich zu größeren zusammen; wahrscheinlich erfolgt das Zusammentreten der Tropfen, weil das sie umgebende Plasma an den Richtungskörperpol entweicht und somit die sie trennende Substanz fehlt.)

Parallel zu diesen Vorgängen verläuft das auffällige Klarwerden der Eier im Ovarium. Wir hatten schon erwähnt (s. S. 2), daß die Oocyten der Stadien II und III durch die vielen Einlagerungen trüb erscheinen. Nach Beendigung der eben geschilderten Prozesse erscheint das befruchtungsfähige Ei vollkommen glasklar durchsichtig. Spek (1933) konnte wahrscheinlich machen, daß dieses Klarwerden auf eine starke Hydratation der Plasmakolloide zurückzuführen ist.

Aus unseren Untersuchungen an fixiertem Material von Maräneneiern ergab sich, daß wahrscheinlich noch ein zweiter Faktor für das Klarwerden der Dottersubstanzen verantwortlich zu machen ist. Solange die Dotterzone trüb erscheint, liegt zwischen den einzelnen Dotterschollen Plasma, wodurch eine Fusion von Dotterschollen miteinander verhindert wird. Jede Dotterscholle reflektiert das Licht, so daß die Dotterzone trübe erscheint. Entweicht jetzt aber das Protoplasma zum Richtungskörperpol, so fällt die Barriere zwischen den einzelnen Dotterschollen fort und sie fusionieren miteinander. Dadurch erscheinen sie jetzt durchsichtig.

Meine Untersuchungen mit den Neutralfett- und Lipoidfärbemethoden wurden durch die schlechte Schnittfähigkeit der Oocyten in diesem Stadium sehr erschwert. In sehr vielen Fällen fällt bei Gefrierschnitten der gesamte Eiinhalt heraus. Das liegt vor allem daran, daß die Oocyten mit Dotterschollen vollgestopft sind, die in sehr wenig Grundplasma eingebettet liegen. Bei der Fixation erhalten die Dotterschollen eine feste Konsistenz, während das fein granuliert Grundplasma verhältnismäßig locker bleibt. Dadurch erreicht man keine fest zusammenhängenden Schnitte, und gute Erfolge sind selten. Bei den Eiern, deren Dotterschollen fusioniert sind und sich schon die erste Anlage der Keimscheibe gebildet hat, ist der durch Fixation fest gewordene Dotter leicht schneidbar. Hier ergibt sich aber eine andere Schwierigkeit: Das fein granuliert Plasma der Keimscheibenanlage ist nur locker mit dem Dotter verbunden, löst sich beim Schneiden ab und, was noch unangenehmer ist, zerbröckelt sehr leicht.

Meine Versuche, mit Gelatine-Einbettung bessere Ergebnisse zu erzielen, blieben erfolglos. Trotz dieser Schwierigkeiten konnte ich einige interessante Ergebnisse erzielen. Das Grundplasma ist im Stadium IV weder mit Sudan-

orange noch mit irgendeinem anderen von uns benutzten Fettfarbstoff anzufärben, es ist also frei von Lipiden, jedenfalls von unmaskierten Lipiden. Die einzelnen Dotterschollen zeigen ähnliche Anfärbungen wie im Stadium III. Mit Sudanorange ist eine orangerote Färbung zu erzielen, Smith-Dietrich- und Romieu-Methode ergeben positive Resultate, so daß wir auf die Anwesenheit von Lipoiden (i. e. S.) schließen können. Mit Nilblausulfat sind die Dottersubstanzen blau gefärbt. Bei stärkerer Differenzierung (s. S. 18) trat schwache Rosadiffusfärbung ein, die auf die Anwesenheit von Triglyceriden hindeutet.

Dieselben Ergebnisse erzielte ich an den Dottersubstanzen, wenn die einzelnen Dotterschollen aufgelöst waren.

Die vielen Fetttropfen, die im Maränenei auftreten, sind zum größeren Teil Lipoidtropfen (positiv mit Smith-Dietrich und Romieu), zum geringeren Teil Neutralfetttropfen (Rosafärbung mit Nilblausulfat).

Mit den Kernfarbstoffen hoffte ich, dem Problem der Richtungskörperbildung bei Teleosteen etwas näher zu kommen. Es ergab sich, daß im unbefruchteten Maränenei keine Bildung von einem Richtungskörperchen beobachtet werden kann. Ich werde bei der Besprechung des befruchteten Eies darauf zurückkommen (s. S. 26).

Die Anfärbung des Grundplasmas, also der Rindenschicht und der Keimscheibenanlage, war nach Zenker- und Carnoy-Fixierung mit den verwendeten Kernfarbstoffen ebenso schwach wie im Stadium III. Die bei den jungen Oocyten so auffällige Basophilie ist also weitgehend verlorengegangen. Die Dotterschollen sind nur mit Gallein stark färbbar. Mit demselben Farbstoff ist auch die mächtige Kortikalschicht ausgesprochen kräftig angefärbt.

Der Kern zeigt, solange er noch nicht aufgelöst ist, mit allen Kernfarbstoffen stark färbbare Nucleolen. Sie liegen z. T. randständig (s. Abb. 9), z. T. aber auch zentral. Die Kernmembran weist nur noch schwache Ausbuchtungen auf. Wahrscheinlich beruht dies darauf, daß der Kern im Stadium IV durch Quellung sein Volumen vergrößert, die Kernmembran aber an Umfang nicht zunimmt.

Nach der Auflösung der Kernmembran verlieren die Nucleolen an Färbbarkeit und sind dann nur noch schwer im nahezu gleichgefärbten, feingranulierten Plasma zu finden. Spindelfiguren zur ersten Richtungskörperbildung konnte ich nicht beobachten.

Mit den übrigen Nachweisen erzielte ich Ergebnisse, die im wesentlichen nichts Neues erbrachten. Die Dotterschollen und auch der fusionierte Dotter verhalten sich wie die Dotterschollen des Stadiums III, so daß wir auf das Vorhandensein von Phosphoproteiden neben den Lipoiden (i. e. S.) schließen müssen (s. S. 18 und 19).

Beim befruchteten Forellenei zeigen nach Speck (1943) die ganze Dottermasse und die Dotterschollen unterhalb des Keimplasmas starke Irisblaureaktion. Das gleiche konnte Kramer (1950) für diese Abschnitte nachweisen. Da nur die freien Phosphatide in der lebenden Zelle die starke rote Fluoreszenz zeigen, müssen diese Areale des Eies viele freie Phosphatide enthalten. Ob daneben noch Lipoproteide, in denen das Lecithin symplex-

artig mit den Eiweißen verbunden ist, vorkommen, konnte nicht entschieden werden.

Die mitgeteilten Befunde stimmen recht gut überein mit den von Spek (1943) mit Vitalfärbung erhaltenen Ergebnissen. Mit Irisblau angefärbte Forelleneier zeigen gar kein rotes Fluoreszenzlicht im Keimplasma und in den Blastomeren. Diese sind also zuerst ganz frei von reinen Phosphatiden. Daß auch keine rein lipophilen Substanzen in ihm vorhanden sind, zeigt am besten die Echtneublaufärbung. Echtneublaufärbung müßte rein lipophile Substanzen (wie Xylol) gelblichrosa färben und ein orangefarbiges Fluoreszenzlicht zeigen. Nichts davon tritt ein. Echtneublau färbt die Blastomeren tiefblau. Dieser Farbton entsteht dadurch, daß die an der oberen Grenze von Grün gelegene Absorptionsbande des Farbsalzes sich durch die Adsorption an den Eiweißkörpern nach dem langwelligen Teil des Spektrums in Gelb verschiebt. Dadurch muß der schmutzige Farbton der Farbsalzlösung in Blau übergehen. Diese Fragen spielten eine Rolle bei einer Diskussion zwischen Spek und Drawert (Jena 1942), bei der Drawert behauptet hatte, daß der alkalische Farbton des Keimplasmas und der Blastomeren nur durch starke Löslichkeit der Farbbasis in einer lipophilen Substanz vorgetäuscht sei. Eine solche lipophile Substanz existiert aber in den Blastomeren gar nicht, und daß die alkalische Reaktion auch nicht durch einen metachromatischen Farbumschlag vorgetäuscht ist, geht daraus hervor, daß der Farbumschlag auch bei Mikroinjektion von den nicht metachromatischen Indikatoren von Clark und Lubbs erhalten wird. Spek (1933) konnte an den aus ihrer Befruchtungsmembran herausgelösten Eiern von *Squalius cephalus* eine ganze Serie von Mikroinjektionen von Phenolrot entlang der Eiachse vom Keimplasma bis in die klare Dotterzone an einer Eizelle ausführen. Im Keimplasma färbt sich der Indikator entsprechend der bipolaren Differenzierung tiefrosa, in der Zwischenzone mit den vielen Tropfen siegelrot und in der vegetativen Hälfte des Eies zitronengelb. Damit brach auch der von Lison erhobene Einwand, daß der alkalische Farbton der verwendeten basischen Farbstoffe durch metachromatische Farbumschläge vorgetäuscht sein kann, zusammen.

Vom Hecht gelangten aus den oben erwähnten Gründen (s. S. 4) nur die befruchtungsfähigen Eier zur Untersuchung. Die Kernmembran ist schon aufgelöst, und das Ei erscheint klar durchsichtig. Im wesentlichen entsprechen die Ergebnisse den Befunden an den befruchtungsfähigen Maränen-eiern, nur daß bei den Hechteiern die Keimscheibenanlage noch nicht so deutlich ausgeprägt ist — offensichtlich nur ein quantitativer Unterschied — und im befruchtungsfähigen Hechtei keine großen Fetttropfen auftreten. Die Fettsubstanzen sind noch emulsoid im Dotter verteilt und verschmelzen erst nach der Befruchtung zu größeren Tropfen, die dann unter die Keimscheibe wandern und den „disque huileux“ bilden.

#### *Untersuchungen am befruchteten Ei*

Nach Ablage des Eies ins Wasser und nach dem Eindringen des Spermatozoons in das Ei wird die bipolare Differenzierung ganz enorm verstärkt. Die Keimscheibenanlage nimmt durch weiteres Zuwandern von Grund-

plasma, vor allem aus der Rindenschicht, wesentlich an Dicke zu. Gleichzeitig zieht sie sich von der Dotterkugel auf einen kleineren Raum zurück, so daß am Ende des Befruchtungsvorganges die Keimscheibe in Form einer bikonvexen Linse in einer Mulde des Dotters liegt; ihr oberer Rand erhebt sich aber bedeutend über die Oberfläche des Dotters. Die Neutralfett- und Lipoidtropfen wandern mit dem Plasma in Richtung Keimscheibe und bilden unter ihr den „disque huileux“ Lereboullets. Bei den Maränen treten dabei die an sich schon großen Tropfen zu noch größeren zusammen. Beim Hecht, bei dem die bipolare Differenzierung im Stadium IV noch nicht so stark ausgeprägt ist, wird durch das Abwandern des Plasmas in die Keimscheibe zunächst die Fetttropfemulsion zerstört, und erst dann entsteht aus den sich zusammenlagernden Fetttropfen der „disque huileux“.

Neben dieser enormen Verstärkung der bipolaren Differenzierung wird aber noch ein anderer auffallender Vorgang, nämlich die Abhebung der Befruchtungsmembran, durch die Besamung ausgelöst. Die Befruchtungsmembran besteht bei den Teleosteen, wie Spek (1933) besonders hervorhob, nicht nur aus der primären Oocytenmembran, sondern aus dieser und der radiärstreifigen Kortikalschicht. Das Abheben der Befruchtungsmembran kommt nach Spek (1933) dadurch zustande, daß das Ei nach dem Austreten ins Wasser eine beträchtliche Steigerung der schon im Stadium IV zu beobachtenden Hydratation erfährt. Die periphere Zone verquillt sehr stark, ihr Plasma zieht sich zu Tropfen zusammen, und es entstehen wäßrige Lakunen unter der Kortikalschicht, die zusammenfließen und so den perivitellinen Saftraum bilden. Bei den meisten Fischarten wird dieser Raum durch extreme Verquellung der Kolloide des perivitellinen Saftraumes noch erheblich vergrößert.

Ich habe bisher nur von den Vorgängen bei der Besamung gesprochen, die sich auf das Verhalten des Plasmas und des Dotters beziehen. Eine entscheidende Frage ist aber noch zu beantworten. Wie verhält sich der Kern der Eizelle, und welche Vorgänge spielen sich ab, bis die Befruchtung eintritt, d. h. die Verschmelzung des weiblichen und des männlichen Vorkerns?

Voraussetzung für die Befruchtung sind die beiden Reifeteilungen. Normalerweise wird bei den Wirbeltieren im unbefruchteten Ei der erste Richtungskörper abgeschnürt, also die erste Reifeteilung vollzogen. Zur Zeit der Ausbildung der zweiten Richtungsspindel dringt das Spermatozoon ein. Bei den Teleosteen liegen die Verhältnisse nicht so klar. Die Arbeiten, die sich mit der Richtungskörperbildung in den Teleosteeiern beschäftigen, weichen in vielen Punkten voneinander ab. Nach Hoffmann (1881), Agassiz und Whitman (1885) und anderen geben vor allem Böhm (1891) und Behrens (1898) einigermaßen übersichtliche Schilderungen der Richtungskörperbildung. Böhm (1891) konnte am Forellenei nachweisen, daß der erste Richtungskörper 1 Stunde und der zweite 1 Stunde und 20 Minuten nach der Besamung abgeschnürt wird. Behrens (1898) fand in den vielen von ihm untersuchten Forelleneiern vor der Besamung bis 2 Minuten nach derselben niemals einen abgeschnürten Richtungskörper. Er nimmt an, daß die in diesem Stadium auftretende Spindel die erste Richtungsspindel ist. Die Abschnürung des ersten Richtungskörpers konnte



er nicht beobachten. Die Bildung des zweiten Richtungskörpers findet nach ihm 1 Stunde und 45 Minuten nach der Besamung statt. Spek (1933) konnte interessante Feststellungen am *Squalius*-Ei machen. Bei diesem Ei, bei dem sich die Befruchtungsmembran sehr weit abhebt, liegt stets nur ein Richtungskörper dem Eikörper an, also unter der Befruchtungsmembran. Spek hält es für wahrscheinlich, daß der erste Richtungskörper noch im Ovar nach außen abgegeben wird. Es besteht die Möglichkeit, daß bei den verschiedenen Fischarten Differenzen hinsichtlich der Richtungskörperbildung vorliegen.

Meine Untersuchungen über diesen so wichtigen Punkt führten an Maräneneiern bisher leider nicht zu befriedigenden Ergebnissen. In den Ovarialeiern (vgl. Stadium IV) und in den Eiern bis zu 2 Stunden nach der Besamung konnte ich keinen Richtungskörper beobachten. Möglicherweise erscheinen die Richtungskörper bei den Maränen noch später. Es muß aber noch weit mehr Material untersucht werden, bevor wir darüber Endgültiges aussagen können.

Das histologische Bild, das wir von dem Ei nach dem Austritt ins Wasser und nach der Besamung erhalten, entspricht in vielen Punkten dem des befruchtungsfähigen Ovarialeies. Nur ist die Sonderung der Substanzen durch die eben geschilderten Vorgänge sehr viel ausgeprägter. Mit den Neutralfett- und Lipoidfärbemethoden erzielte ich bei Maränen- und Hechteiern folgende Ergebnisse:

Die Keimscheibe und die Rindenschicht sind mit allen verwendeten Lipidfarbstoffen nicht färbbar, enthalten also keine unmaskierten Lipide (vgl. S. 24). Unter der Keimscheibe liegt die Masse der Fetttropfen, die mit Sudanorange leuchtend orangerote Anfärbung ergeben. Die größere Zahl dieser Tropfen besteht aus Lipoiden (i. e. S.). Sie sind mit Smith-Dietrich schwarzblau und mit dem Lecithin-Nachweis nach Romieu mahagonirot gefärbt. Eine Reihe von Tropfen, die vor allem in der Peripherie des „disque huileux“ liegen, erweisen sich als Neutralfettspeicher, da sie mit Nilblausulfat Rosafärbung zeigen.

Der homogene Dotter ist mit Sudanorange schwach färbbar. Der Smith-Dietrich-Nachweis und die jodophile Reaktion nach Romieu verlaufen positiv, deuten also auf die Anwesenheit von Lipoiden (i. e. S.) hin. Nilblausulfat färbt die gesamte Dotterzone blau, nach stärkerer Differenzierung ist wie im Stadium III eine schwache Rosafärbung festzustellen.

Mit den Kernfarbstoffen erzielte ich Anfärbungen, die im wesentlichen mit denen am befruchtungsfähigen Ei übereinstimmen. Hämalaun, Methylgrün und Gallocyanin tingieren in Paraffinschnitten die Keimscheibe und die Rindenschicht nur schwach. Der Dotter bleibt fast ungefärbt. Gallein färbt die Dotterschollen und in noch stärkerem Maße die Befruchtungsmembran an. Die formfixierten Gefrierschnitte verhalten sich auch in diesem Stadium anders. Mit Hämalaun z. B. ist die Dottersubstanz blauviolett, die Keimscheibe und die Rindenschicht blau gefärbt. Irgendwelche besondere Differenzierungen zeigen sich nicht. Eine Erklärung für



das unterschiedliche Verhalten in der Färbbarkeit bei Paraffin- und Gefrierschnitten gab ich schon bei der Besprechung des Stadiums III (s. S. 32).

Die übrigen Ergebnisse entsprechen dem Befund im Stadium IV, so daß ich auf ihre Beschreibung verzichten kann.

Zum Abschluß möchte ich noch auf einige Befunde eingehen, die die Verteilung der Lipide in den frühen Entwicklungsstadien des Hechtes zeigen. Die Untersuchungen über das Verhalten der Lipide werden außerordentlich erschwert durch die sehr schlechte Schnittfähigkeit des Eies mit dem Gefriermikrotom. Vor allem die Diskrepanz in der Härte des Dotters und des Keimplasmas macht sich sehr störend bemerkbar. Ein Herauslösen der Dottersubstanzen, wie es von Virchow-Kopsch u. a. beschrieben wird, kommt für unsere Untersuchungen nicht in Frage, da mit dem Dotter auch die vielen Fetttropfen entfernt würden und dadurch eine Aussage über das Verhalten der Fettsubstanzen nicht mehr möglich ist.

Einigermaßen brauchbare Gefrierschnitte erhielt ich noch am ehesten von den frühen Entwicklungsstadien bis etwa zur Blastula. Wenn ca. 8–10 Stunden nach der Besamung die ersten Furchungsteilungen einsetzen, liegen die vielen Fetttropfen teils in den untersten Partien des Keimplasmas, teils im Dotter. Im 16-Zellen-Stadium ist der Keim noch einschichtig. Sämtliche Zellen stehen hier noch miteinander und mit der Rindenschicht in Verbindung, da die Furchen nicht durch die ganze Keimscheibe hindurchgehen. Erst bei den weiteren Teilungen furchen sich die meisten Blastomeren gänzlich ab.

Beim Hecht bleibt der Teil des Keimplasmas, der dem Dotter direkt aufliegt, ungefurcht. In diesem Teil liegen Neutralfett- und Lipoidtropfen. Am Rande der Keimscheibe verdickt sich dieser ungefurchte Rest des Bildungsplasmas zu dem sogenannten Keimwall, der kontinuierlich in die Rindenschicht übergeht. Der Keimwall ist syncytial mit den über ihm liegenden Blastomeren verbunden. Bei der Teilung dieser Blastomeren gehen laufend Kerne in den ungefurchten Teil über (sogenannte Periblastkerne). Der in diesem Stadium noch ungefurchte Teil des Bildungsplasmas stellt den Periblast dar. Bei unseren Untersuchungen mit den Fettfärbemethoden konnten wir im Periblast neben einigen Neutralfetttropfen eine Menge kleiner Lipoidtropfen feststellen, in einigen dem Keimwall anliegenden Blastomeren erzielten wir positive Lipoidreaktionen (Smith-Dietrich, Romieu). Wir können allerdings nicht entscheiden, wie diese Lipide in die Blastomeren hineingelangt sind. Dazu reichte die Schnittechnik nicht aus. Es liegt der Gedanke nahe, daß die Lipide des Periblasten bei der Abfurchung in die Blastomeren gelangen.

Leider war es nicht möglich, das Phänomen zu deuten, auf welches Spek (1943) aufmerksam wurde, wie nämlich die Lipide in die Medullarplatte hineingelangen. Er beobachtete, daß der Keim vor der Medullarplattenbildung fast vollkommen frei von ungebundenen Lipiden ist, dann aber bei der Medullarplattenbildung in der Medullarplatte eine Menge von Lipiden enthält, die sich bei der Ausbildung des Neuralrohres noch weiter vermehren. Sein Schüler Krammer (1950) hatte am Hecht festgestellt,

daß bei beginnender Gastrulation in der dorsalen Urmundlippe die Lipoiden stark angereichert sind. Da vorher nur im Randwulst Lipoiden anzutreffen sind, muß eine Diffusion der Lipoiden zur Einstülpungsstelle hin angenommen werden. Bei der Umbildung der dorsalen Urmundlippe zum Randknopf sind dann erstmalig auch in der Medullarplatte Lipoiden zu finden. Ob die Lipoiden vom Urdarmdach in das darüberliegende Ektoderm in der Art von Organisatorsubstanzen, vielleicht sogar als Träger derselben, hindiffundieren, oder ob die Lipoiden des Randwulstes bei dem einsetzenden Längenwachstum nur auf die von ihm gebildeten Ektodermzellen verteilt werden, so daß dadurch die Lipoiden in die Medullarplatte hineingelangen, konnte Krammer nicht entscheiden. Wir wollen versuchen, dieses Problem in einer späteren Arbeit mit modernen Lipoidnachweisen und mit verbesserter Schnitttechnik zu klären.

### Diskussion der Ergebnisse

Wie ich in der Einleitung schon ausführte, war ein Hauptziel meiner Untersuchungen, das Auftreten und die Verteilung der Lipide während der Oogenese und der bipolaren Differenzierung bei Süßwasser-Teleosteen zu klären. In der Literatur finden wir nur einige wenige Arbeiten, die sich mit diesem Problem befassen. Konopacka (1935, 1937) untersuchte in der Hauptsache die Lipidverteilung in den Oocyten mariner Teleosteen. Sie kam zu dem Ergebnis, daß junge Oocyten zunächst keine auffallenden Fettsubstanzen besitzen. Im Laufe des Wachstums der Oocyten treten zuerst „glycérides“ — gemeint sind Triglyceride, also Neutralfette — auf, die sich dann später nach dem Erscheinen von Eiweißschollen mit diesen Eiweißen zu „phosphoprotéides“ — sie versteht darunter wohl Lipoproteide — verbinden. Im Moment des Zusammentretens von Eiweißen und Triglyceriden sollen Phosphatide, d. h. Lipoiden im eigentlichen Sinne, entstehen. Die letzten Stadien vor der Befruchtung wurden von ihr nicht untersucht.

Meine Befunde ergaben ein gänzlich anderes Bild. Als erste Lipidkomponente traten bei den von mir untersuchten Süßwasser-Teleosteen immer Lipoiden (i. e. S.) auf, und zwar in jungen Oocyten, die noch keine größeren Einlagerungen zeigen. Dies hatte schon Spek (1941) an lebenden *Leuciscus*-Oocyten mit der Irisblau-methode (s. S. 3) gefunden. Es müssen also, wie auch Konopacka betonte, bedeutende Unterschiede in der Dotterbildung bei marinen und Süßwasser-Teleosteen bestehen.

Die Lipoiden liegen diffus im Plasma verteilt. Während der Ausbildung der Rindenvakuolen erfahren sie keine feststellbaren Veränderungen. Erst wenn im Stadium III im Plasma die Dotterschollen entstehen, setzt auch eine Vermehrung der Lipoiden ein. Sie sind jetzt nicht nur im Grundplasma, sondern in noch stärkerem Maße in den Dotterschollen nachzuweisen. Ein Übergang von Lipoiden in eventuell vorher gebildete reine Eiweißdotterschollen war niemals zu beobachten. Die ersten entstehenden Dotterschollen zeigen vielmehr sofort positive Phosphoproteidreaktion, womit Eiweiße mit

der prosthetischen Gruppe Phosphorsäure gemeint sind, und Lipoidreaktion. Reine Lipoid- oder Neutralfetttropfen findet man im Stadium III weder bei *Leuciscus* noch bei *Cyprinus*.

Auch bei stärkster Ausbildung der Dotterschollenschicht, also am Ende des Stadiums III, sind immer noch Lipoide im Grundplasma nachzuweisen. Neben diesen Lipoiden werden in diesem Stadium auch Neutralfette gebildet. Sie sind in den Dotterschollen lokalisiert. Diese verhältnismäßig reaktionsträgen und energiereichen Substanzen stellen die letzten Lipidbildungen im Laufe des Dotterwachstums dar. Im Stadium IV und später im befruchteten Ei kann man nur noch Verlagerungen der einzelnen Fettsubstanzen beobachten. Wie unsere Ergebnisse am Hecht (*Esox lucius*) und an der Maräne (*Coregonus albula lucinensis*) zeigen, bestehen hinsichtlich dieser Verlagerungen bei den einzelnen Teleosteerarten gewisse Unterschiede. Übereinstimmend verhält sich das Grundplasma, das im Stadium IV keine positiven Reaktionen mehr auf Fettsubstanzen ergibt.

Beim Hecht sind die Lipide zunächst vollkommen homogen im Dotter verteilt. Erst am Ende des Stadiums IV bilden sich kleine Lipoidtropfen unter der Keimscheibenanlage aus. Nach der Besamung entstehen weitere in der Dottermasse, die dann miteinander zu größeren zusammenfließen und sich in typischer Weise in dem sogenannten „disque huileux“ unter der Keimscheibe anordnen. Dazu kommen dann noch aus der Dottermasse größere Neutralfetttropfen. Trotz dieser Abgabe von Lipiden an den „disque huileux“ behält der Dotter seine stark positive Lipoidreaktion bei.

Bei der Maräne sieht das Bild insofern anders aus, als hier schon im Stadium III Neutralfett- und Lipoidtropfen entstehen, die dann, nachdem sie an Größe zugenommen haben, in auffälliger Weise die beginnende bipolare Differenzierung im Stadium IV mitmachen. Die Vorgänge im befruchteten Ei entsprechen denen beim Hecht.

Als Ergebnis der bipolaren Differenzierung können wir folgende Lipidverteilung konstatieren: In dem „disque huileux“ liegen Lipoide und Neutralfette in Tropfenform vor, im Dotter sind Lipoide diffus verteilt vorhanden, die Keimscheibe sowie die Rindenschicht dagegen enthalten keinerlei Lipide.

Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit den Untersuchungen Kramers (1950, unveröff.) überein. Mit der Irisblaumethode Speks (s. S. 3) konnte er am lebenden Hechtei gleiche Verhältnisse feststellen. Auch meine Befunde an den ersten Entwicklungsstadien des Hechtes bestätigen die Ergebnisse Kramers. Der wohl wesentlichste Befund ist die positive Lipoidreaktion in den dem Keimwall anliegenden Blastomeren, da er uns den Weg zeigt, wie die Lipoide in die Keimscheibe gelangen können. Die großen Schwierigkeiten, die sich bei der Schnittechnik ergeben haben, beweisen, welche Vorteile die Anwendung der Irisblaumethode nach Spek für die Lipiduntersuchungen am lebenden Objekt bieten. Einmal entfallen die bei der Schnittmethode eventuell auftretenden Fixierungsartefakte, zum anderen ist die Methode wesentlich einfacher.

Ein weiterer Schwerpunkt meiner Arbeit lag in den Untersuchun-

gen mit Kernfarbstoffen. Wir konnten von vornherein erwarten, daß sich ähnliche Bilder ergeben würden, wie sie schon von vielen Autoren für Oocyten mit starker Dotterbildung beschrieben worden sind.

Koch (1925), Bauer (1931), Ries (1932) u. a. fanden in solchen Oocyten vor allem färberische Umstimmungen des Kerns, d. h. der ursprünglich stark basophile Kern wird oxyphil. Außerdem beobachteten sie auffällige Vermehrung der Nucleolarsubstanz und damit zusammenhängend entweder starke Oberflächenentfaltung der Kernmembran oder sogar Austreten von Nuclearsubstanz durch die Kernmembran hindurch in das Plasma der Eizelle (sogenannte Chromidien nach Ries). Die Feulgen-sche Reaktion auf Thymonucleinsäure fällt nur noch schwach positiv aus. Auch das Plasma der Eizelle verhält sich vor allem zu Beginn der Dotterbildung stark basophil.

Caspersson (1936—1941) gab für dies auffällige Verhalten der Eizellen zum erstenmal eine mikrochemisch begründete Erklärung. Er konnte mit Hilfe seiner neuen Untersuchungsmethodik (Messung von UV-Absorptionsspektren) einwandfrei feststellen, daß die Eizelle sowie die meisten Embryonalzellen Vertreter eines Zelltyps sind, der durch Hyperfunktion des Heterochromatin-Nucleolensystems ausgezeichnet ist. Die in diesen Zellen reichlich auftretenden Cytoplasma-Nucleotide sollen eine spezielle Funktion bei der Produktion von Eiweißstoffen im Protoplasma haben.

In der Folgezeit sind eine große Anzahl von Arbeiten über das Verhalten der Ribonucleinsäure (RNS) und der Desoxyribonucleinsäure (DNS) während der Oogenese der verschiedensten Tiere erschienen. Es würde im Rahmen dieser Arbeit zu weit führen, auf alle diese Arbeiten einzugehen. Brachet (1952), der die Methylgrün-Pyronin-Methode zu einem Nachweis für RNS und DNS ausbaute (Ribonuclease) und maßgeblich auf diesem Gebiet gearbeitet hat, gibt einen Überblick über die diesbezüglichen neueren Arbeiten.

Überall wird übereinstimmend die starke Zunahme von RNS im Plasma der jungen Oocyten beschrieben. Während der Dotterbildung nimmt der Gehalt an RNS allmählich ab. Die Nucleolen sind stark pyroninophil. Die Feulgen-Reaktion fällt beim Kern der wachsenden Oocyten nur schwach positiv aus.

Eine Arbeit von Chaudhry (1951) beschäftigt sich mit dem Verhalten der Nucleolen in den Oocytenkernen von marinen Teleosteen. Er konnte das Austreten von Nucleolen in das Plasma wahrscheinlich machen.

Vergleiche ich nun meine Ergebnisse mit diesen Befunden, so ergeben sich viele Übereinstimmungen. Die jungen Oocyten des Stadiums I — die Übergänge von Oogonien zu Oocyten wurden nicht eingehend untersucht — zeigen einen großen blasenförmigen Kern mit sehr vielen basophilen Nucleolen. Der übrige Kerninhalt verhält sich acidophil. Irgendwelche Feulgen-positive Substanzen lassen sich nicht nachweisen. Das Plasma ist stark basophil. Daraus kann man schließen, daß in den Nucleolen und im Plasma eine große Menge von Ribonucleotiden vorliegen. Ich nehme nach Caspersson an, daß diese vielen

Ribonucleotide maßgeblich an der enormen Eiweißdottersynthese beteiligt sind, die im Laufe des Wachstums der Oocyte erfolgt.

Erstaunlich ist, daß man im Kern keinerlei Spur von Feulgen-positiven Elementen feststellen kann. Nach Feulgen sind in großen blasenförmigen Kernen — und um solche handelt es sich ja hier — die Nuclealstoffe so sehr verteilt, daß es zu keiner Anfärbung kommt. H. Bauer (1931) nimmt eine chemische Veränderung der Chromosomensubstanz an. Ich halte das erstere für wahrscheinlicher.

Verfolgen wir nun das Verhalten des Kerns und des Plasmas bei der Dotterbildung, so können wir allmählich eine Abnahme in der Basophilie des Plasmas feststellen. Diese Abnahme kann bei Gefrierschnitten u. U. verdeckt werden (s. S. 32). Die Basophilie durch Ribonucleotide muß in jedem Falle in Zenger-Paraffinschnitten erkennbar sein, so daß ich in diesem Zusammenhang nur von den Ergebnissen an Paraffinschnitten berichten will. Während die Basophilie des Plasmas also langsam abnimmt, verändert der Kern seine Reaktion mit den Kernfarbstoffen nicht. Die Kernmembran bildet kleine Zotten, in die die vielen Nucleolen hineinwandern. Wir deuten diese typischen „Arbeitsstrukturen“ des Kerns als ein Zeichen für die große Aktivität, die der Kern während der Dotterbildung entfaltet (vgl. z. B. Ries, 1932). Die Oocyte zeigt diese Verhältnisse im Stadium II während der Bildung der Rindenvakuolen und noch stärker später auf dem Höhepunkt der Dotterbildung im Stadium III.

Hierbei ist noch zu erwähnen, daß der Kern nicht im gleichen Maße wie die Oocyte an Umfang zunimmt (s. Tab. 2). Doch braucht sich hierbei die Kern-Plasma-Relation nicht erheblich zu verändern. Wir müssen bedenken, daß die Größenzunahme der Oocyte im wesentlichen auf den umfangreichen Dotterbildungen beruht. Das Plasma vermehrt sich bei weitem nicht so stark.

Wenn die Oocyte in das Stadium IV eintritt, beginnt zunächst der Kern an die Peripherie zu wandern. Dabei wird die Kernmembran wieder nahezu glatt, wahrscheinlich weil eine weitere Quellung des Kerninhalts erfolgt. Die Nucleolen sind stark basophil. Nach der Wanderung des Grundplasmas an den Richtungskörperpol zur Bildung der Keimscheibenanlage im Laufe der beginnenden bipolaren Differenzierung platzt die Kernmembran, und der Kerninhalt tritt ins Plasma über. Dabei verlieren die Nucleolen so stark an Färbbarkeit, daß sie nur noch undeutlich im ebenso schwach basophilen Plasma zu erkennen sind. Auf welche Weise nun aus dem Material des aufgelösten Kerns wieder die Feulgen-positiven Chromosomen entstehen und wie dann die Richtungkörperbildung erfolgt, konnte ich an den Maräneneiern leider nicht feststellen. Über diesen Punkt müssen Nachuntersuchungen am dafür geeigneten Maränenei ausgeführt werden. Wir halten diesen Punkt deshalb für so wichtig, weil die beiden Reifeteilungen vielleicht am Zustandekommen der bipolaren Differenzierung beteiligt sind. Einmal kann die erste Reifeteilung für die beginnende Differenzierung im unbefruchteten Ei, zum anderen die zweite Reifeteilung für die enorm verstärkte bipolare Sonderung im befruchteten Ei eine große Rolle spielen.



Außerdem würde das Problem der Chromosomenkonstanz während der Oogenese einer Klärung nähergebracht werden können. Die Befunde der älteren Autoren über die Reifeteilung bei Teleosteen haben wir schon an anderer Stelle besprochen (s. S. 25).

Bei den Untersuchungen mit den Kernfarbstoffen habe ich schon mehrfach auf den Unterschied in der Anfärbung der Oocyten bei formolfixierten Gefrierschnitten und Zenker-fixierten Paraffinschnitten hingewiesen. Ich nehme an, daß dieses Verhalten durch das Auftreten von sauren Dottersubstanzen (Phosphoproteide) bedingt ist, die vielleicht ihren stark sauren Charakter durch die Zenker-Fixierung oder — was noch wahrscheinlicher ist — durch die Alkoholbehandlung verlieren (Abspaltung der prosthetischen Gruppe Phosphorsäure). Danach müßten also schon in jungen Oocyten (Stadium I) geringe Mengen von Phosphoproteiden diffus verteilt vorhanden sein (vgl. Abb. 1 und 2). (Millons Reagens färbt die Oocyten schwach rot an.) Sie würden damit parallel zu den Lipoiden entstehen und auch ähnlich angeordnet sein. In den Oocyten des Stadiums III treten dann in den Dotterschollen wesentlich mehr Eiweiße auf, die wieder in formolfixierten Gefrierschnitten, aber nicht in Zenker-fixierten Paraffinschnitten mit Kernfarbstoffen färbbar sind. Die Dotterschollen zeigen außerdem stark positive Reaktionen mit Millons Reagens. Wie biochemische Untersuchungen der Dottersubstanzen der Teleostee (vor allem am Karpfen) ergeben haben, kommt in ihnen als eine Hauptkomponente das Ichthulin vor. Ichthulin gehört zu den Ovovitellinen, die eine Gruppe der Phosphoproteide darstellen. Unsere Anfärbungen finden damit eine Erklärung.

Die Dotterschollen würden demnach neben den Lipoiden vor allem Ichthulin enthalten. Diese Verhältnisse zeigten die von mir untersuchten Fischarten. Ich möchte betonen, daß wir nicht ohne weiteres daraus allgemeingültige Regeln für die Dotterbildung bei allen Teleosteen aufstellen können, ergab doch z. B. die Arbeit Konopackas (1937) für die Dotterbildung einiger mariner Teleostee z. T. andere Befunde.

Im Stadium IV tritt keine chemische Veränderung der Dottersubstanzen auf. Bei der Maräne und beim Hecht wird nur das morphologische Bild verändert. Starke Hydratation (nach Spek 1933) und das Entweichen des einzelnen Dotterschollen trennenden Protoplasmas führen zu einer Fusion der Dotterschollen, die dann die typische homogene Dotterkugel des befruchteten Eies bildet.

Als letzte Substanzgruppe müssen wir noch die Rindenvakuolen diskutieren. Sie werden im Stadium II gebildet und nehmen rasch an Zahl zu, so daß sie bei der Plötze z. B. im Stadium II den Raum zwischen Kern und Oocytenmembran fast gänzlich anfüllen. Diese Rindenvakuolen sind nach meiner Meinung hauptsächlich für den Aufbau der radiärstreifigen Kortikalschicht bestimmt. Dafür spricht einmal die Kortikalschichtbildung in dem Moment, wenn gegen Ende des Stadiums II die Auflösung der ersten Rindenvakuolen erfolgt, zum anderen die Galleinfärbung und die Rotfärbung mit Millons Reagens, die sowohl in den Rindenvakuolen als auch



in der Kortikalschicht positiv ausfallen. Über die chemische Natur der Rindenvakuolen geben uns neben diesen beiden Anfärbungen die positive, speichelresistente Polysaccharidreaktion nach H. Bauer und die metachromatische Färbung mit Toluidinblau und polychromem Methylenblau Aufschluß. Ich schließe daraus, daß vor allem Mucopolysaccharide in den Rindenvakuolen vorliegen.

Verfolgen wir das Verhalten der Rindenvakuolen im Laufe der Oogenese, so können wir feststellen, daß im Stadium III die Rindenvakuolen in verhältnismäßig dünner Lage unter der mächtig herangewachsenen Kortikalschicht liegen. Wenn dann im Stadium IV die Dotterbildung und das Wachstum der Kortikalschicht abgeschlossen sind, sind die Rindenvakuolen verschwunden. Ob vielleicht noch Reste von den Rindenvakuolen im befruchtungsfähigen Ei im Grundplasma unter der Kortikalschicht liegen bleiben, die dann nach der Besamung bei der Bildung des perivitellinen Safttraumes beteiligt sind, konnte nicht entschieden werden.

Vergleichen wir abschließend unsere Befunde mit den Ergebnissen Speks (1933), so können wir trotz der völlig anderen Untersuchungsmethodik in vielen Punkten eine Übereinstimmung erkennen. Die saure Reaktion des Plasmas in den jungen Oocyten (pH 5,8), die Spek durch Vitalfärbung und Mikroinjektionen von Clark-Lubs-Indikatoren fand, könnte durch die große Menge von Ribonucleinsäure im Plasma hervorgerufen werden. Das Auftreten der alkalischen Substanzen, das Spek so eindrucksvoll demonstrieren konnte, war mit unseren Methoden nicht nachzuweisen. Die Beschreibung Speks von der Rindenvakuolenbildung in der Peripherie der Oocyte und die Entstehung der Kortikalschicht aus ihnen wurde durch unsere Untersuchungen bestätigt. Auch die weiteren Stadien der Dotterbildung verliefen so, wie Spek es mit Hilfe der Vitalfärbungen beobachtet hatte. Zwischen Kern und Peripherie entstehen sehr viele saure Dottersubstanzen, die schließlich den Hauptteil der Oocyte anfüllen. Bis zu diesem Stadium zeigt die Oocyte streng konzentrischen Aufbau.

Die bipolare Differenzierung, die im Ovarialei beginnt und im befruchteten Ei vollendet wird, besteht nicht in einer Neubildung, sondern beruht auf einer Wanderung der vorhandenen Substanzen. Dabei ist für das Teleosteer-Ei charakteristisch, daß nach Abschluß der Wanderung die Trennung in alkalische und saure Substanzen so stark ausgeprägt ist, daß es nur noch zu einer diskoidalen Furchung kommen kann. Ähnlich weitgehende bipolare Differenzierung wurde von Spek (1934) an Cephalopoden-Eiern festgestellt. Die Anneliden-Eier (Spek 1930, 1934) und Prosobranchier-Eier (Spek 1934) zeigen nicht dieselbe scharfe Trennung von alkalischen und sauren Kolloiden, so daß man bei diesen Formen auch im befruchteten Ei noch alle Übergänge zwischen stark alkalischer Reaktion am animalen Pol und stark saurer am vegetativen Pol nachweisen kann. Diese Eier furchen sich total. Eine bipolare Differenzierung im Sinne Speks fanden Ries und Gersch (1936) auch bei dem Opisthobranchier *Aplysia*. Das Ei verhält sich wie die zuletzt geschilderten.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Josef S p e k, möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen für seine wertvollen Anregungen und Ratschläge sowie das rege Interesse, das er meiner Arbeit jederzeit entgegenbrachte.

#### Literatur

- Baker, J. R., 1946: The histochemical recognition of lipine. *Quart. J. microsc. Sci.* 87, 441.
- Bauch, G., 1953: Die einheimischen Süßwasserfische. Radebeul und Berlin.
- Bauer, H., 1932: Die Feulgensche Nuklealfärbung in ihrer Anwendung auf cytologische Untersuchungen. *Z. Zellforsch.* 15, 225—247.
- Behrens, G., 1898: Die Reifung und Befruchtung des Forelleneies. *Anat. H. X*, 227.
- Boehm, A. A., 1891: Die Befruchtung des Forelleneies. *S.ber. Ges. Morph. u. Physiol. Münch.* 7, 63—75.
- Böhminghaus, H., 1927: Über den Wert der Nilblau-Methode für die Darstellung der Fettsubstanzen. *Ziegl. Beitr.* 67.
- Brachet, J., 1952: Le rôle des acides nucléiques dans la vie de la cellule et de l'embryon. Liège-Paris.
- 1952: The role of the nucleus and the cytoplasm in synthesis and morphogenesis. *Symp. Soc. exper. Biol.* 6, 173—200.
- Cain, A. J., 1950: The histochemistry of lipoids in animals. *Biol. Rev. Cambridge philos. Soc.* V, 25.
- Caspersson, T., 1956: Über die Chemie des Zellkerns. *Skand. Arch. Physiol. (D.)* 73, Suppl. 8.
- 1940: Über Eiweißstoffe im Chromosomengerüst. *Naturw.* 28.
- Caspersson, J., und B. Thorell, 1941: Der endozelluläre Eiweiß- und Nucleinsäure-Stoffwechsel in embryonalem Gewebe. *Chromosoma* 2, 132—154.
- Chaudhry, S., 1950: Nuclear activity in the oocytes of some marine teleostean fishes. *J. microsc. Soc.* 70/71, Ser. 3, 87—93.
- Cunningham, J. T., 1898: On the histology of the ovary and of the ovarian ova in certain marine fishes. *Quart. J. microsc. Sci.* V, XL, 101—165.
- Dietrich, A., 1910: Zur Differentialdiagnose der Fettsubstanzen. *Verh. dtsh. path. Ges.* 14.
- Gabe, M., et M. Prenant, 1950: Contribution a l'histologie de l'ovogenèse chez les polyplacophores. *La cellule* 53, 99—116.
- Halliday, N., 1939: Wirkung der Formolfixierung auf die Leberlipoide. *J. biol. Chem. (Am.)* 129, 65.
- Hertwig, Osc., 1906: Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere. Jena. Darin: Hertwig, R.: Eireife und Befruchtung; Der Furchungsprozeß.
- Flemming, H.: Die Lipoidverteilung in den Oocyten der Teleosteer. Diplomarbeit, Universität Rostock.
- His, W., 1873: Untersuchungen über das Ei und die Entwicklung bei Knochenfischen. Leipzig.
- Hoffmann, C. K., 1881: Notizen über das Ei und die Eientwicklung von Salmoniden. *Schweiz. Liter. Naturkund., Verhandl. koninkl. Akad.* 21.
- Kaufmann, C., und E. Lehmann, 1926: Kritische Untersuchungen über die Spezifitätsbreite histochemischer Fettdifferenzierungsmethoden. *Zbl. Path.* 37, 145.

- Kaufmann, C., und E. Lehmann, 1926: Sind die in der histologischen Technik gebräuchlichsten Fettdifferenzierungsmethoden spezifisch? *Virchows Arch.* 261.
- 1928: Über den histochemischen Fettnachweis im Gewebe. *Virchows Arch.* 270.
- Kiesel, A., 1932: Chemie des Protoplasmas. *Protoplasma-Monographien* 4.
- Kleeberg, J., 1923: Untersuchungen über den Fettstoffwechsel der Gewebe. *Virchows Arch.* 244.
- Koch, A., 1925: Morphologie des Eiwachstums der Chilopoden. *Z. Zellforsch. usw.* 2.
- Konopacka, B., 1935: Recherches histochimiques sur le développement des poissons I: La vitellogénèse chez le Goujon (*Gobio fluviatilis*) et la carpe (*Cyprinus carpio*). *Bull. internat. Acad. pol. Sci. Cl. Sci. math. et natur.: Sér. B.* II, Nr. 1—23, II.
- 1937: Recherches histochimiques sur le développement des poissons II: La vitellogénèse chez certains Téléostéens de mer (*Gobius paganellus*, *Smaris alcedo*, *Crenilabrus pavo*, *Atherina Boyeri* et *Atherina hepsetus*). *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* 16.
- Krammer, K., 1950: Über die Verteilung der Lipoide bei der Entwicklung des Teleosteer-Eies. Dissertation, Rostock.
- Lepeschinskaja, O. B., 1952: Die Entstehung von Zellen aus lebender Materie und die Rolle der lebenden Materie im Organismus. 32. Beih. zur „Sowjetwiss.“. Berlin.
- Lison, L., 1936: *Histochimie animale*. Paris.
- Needham, J., 1931: *Chemical Embryology*. Cambridge.
- Oellacher, J., 1872/73: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Knochenfische nach Beobachtungen am Bachforellenei. *Z. wiss. Zool.* 22, 373; 23, 1.
- Panijel et J. Pasteels, 1951: Analyse cytochimique de certains phénomènes de recharge en ribonucléoprotéines: Le cas de l'œuf de *Parascaris equorum* lors de fécondation. *Arch. Biol. (Fr.)* 62.
- Pasteels, J., 1948: Recherches sur le cycle germinal chez l'*Ascaris*. Étude cytochimique des acides nucléiques dans l'oogénèse, la spermatogénèse et le développement chez *Parascaris equorum* Goerze. *Arch. Biol. (Fr.)* 59.
- Ries, E., 1932: Die Prozesse der Eibildung und des Eiwachstums bei Pediculiden und Mallophagen. *Z. Zellforsch. usw.* 16.
- 1938: *Grundriß der Histophysiologie*. Akad. Verlagsges. Leipzig.
- und Gersch, 1936: Zelldifferenzierung und Zellspezialisierung während der Embryonalentwicklung von *Aplysia limacina*. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* 1936.
- Romeis, B., 1929: Weitere Untersuchungen zur Theorie und Technik der Sudanfärbung. *Z. mikrosk.-anat. Forsch.* 16.
- Taschenbuch der mikroskopischen Technik. München. 13. Aufl. (1932) und 15. Aufl. (1948).
- Romieu, M., 1927: Signification de la réaction iodophile du protoplasme et de quelques autres constituants des tissus. *C. r. Soc. Biol.* 96.
- Specht, J., 1923: Über Säurebildung bei der Formolfixierung. *Verh. path. Ges.* 19, Tg., 222.
- Spek, J., 1930: Zustandsänderungen der Plasmakolloide bei Befruchtung und Entwicklung des *Nereis*-Eies. *Protoplasma* 9.
- 1933: Die bipolare Differenzierung des Protoplasmas des Teleosteer-Eies und ihre Entstehung. *Protoplasma* 18.
- 1934: Die bipolare Differenzierung der Eizellen von *Nereis limbata* und *Chaetopterus pergamentaceus*. *Protoplasma* 21.

- Spek, J., 1934: Die bipolare Differenzierung des Cephalopoden- und des Prosobranchier-Eies. Arch. Entw.mechan. 151.
- 1943: Eine optische Methode zum Nachweis von Lipoiden in der lebenden Zelle. Protoplasma 37.
- Verne, J., 1929: Étude histochimique des substances aldéhydiques formées en cours du métabolisme des corps gras. Ann. Physiol. (Fr.) 5.
- Zeiger, K., 1938: Physikochemische Grundlagen der histologischen Methodik. Leipzig.
- Ziegler, E., 1902: Lehrbuch der vergleichenden Entwicklungsgeschichte der niederen Wirbeltiere. Jena.



Bild 1. Oocyte im Stadium I von *Cyprinus carpio*. Formol, Gefrierschnitt, Nilblausulfat (L. Smith). Obj. 40, Ok. 7.

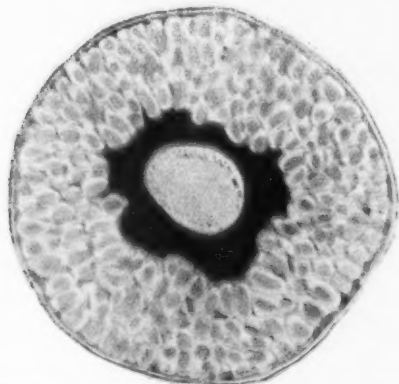


Bild 2. Oocyte im Stadium II von *Leuciscus rutilus*. Formol, Gefrierschnitt, Hämalau. Obj. 8, Ok. 10.

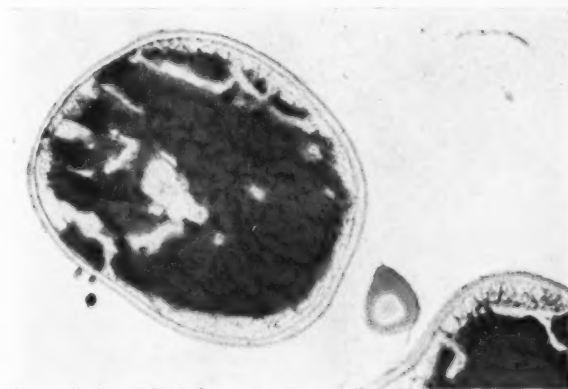
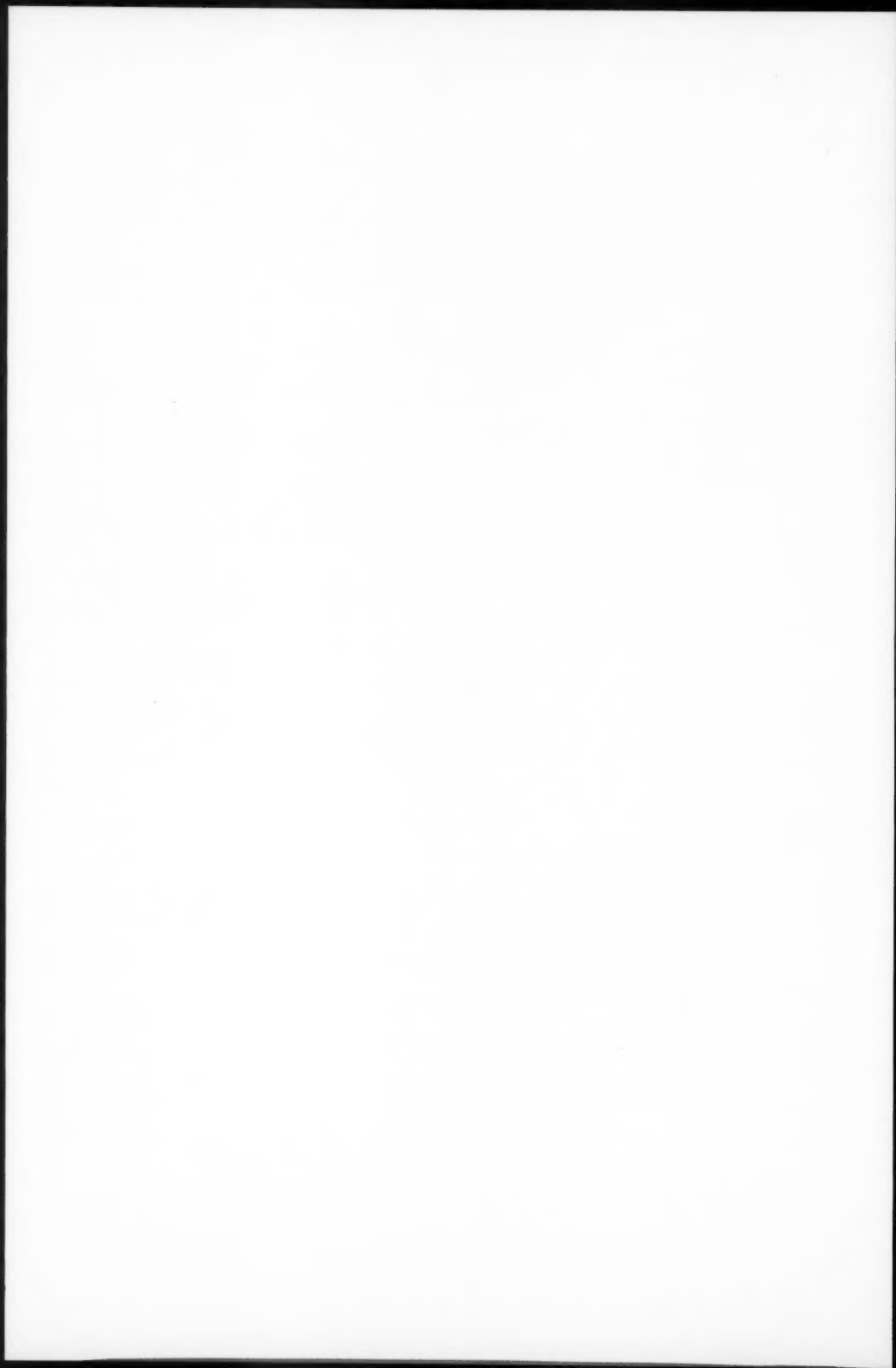


Bild 3. Oocyte im Stadium III von *Leuciscus rutilus*. Formol, Gefrierschnitt, Sudanorange. Obj. 3, Ok. 63, proj.





# Die Fällungsmetachromasie der chromotropen Substanzen der Ciliaten und Flagellaten

Von

Heino Woohsmann

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Rostock

Mit 3 Textabbildungen und 1 Tafel

(Eingegangen am 15. Mai 1955)

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Die Kriterien der Fällungsmetachromasie . . . . .	37
2. Die Bresslauschen Versuche . . . . .	39
3. Material und Technik . . . . .	40
4. Farbstoffversuche an Colpidienhüllen . . . . .	43
5. Metachromasieerscheinungen an Trichocysten . . . . .	49
6. Metachromasieerscheinungen an den Gallertsubstanzen der Flagellaten . . . . .	52
7. Färbungen mit anderen Schleimfarbstoffen . . . . .	58
8. Diskussion . . . . .	58
9. Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	64
10. Literatur . . . . .	64

## 1. Die Kriterien der Fällungsmetachromasie

Im Rahmen einer Versuchsserie entdeckten Spek und Gillissen, daß die Membranen der *Amoeba proteus* aus einer chromotropen Substanz bestehen (Spek 1943). Wenn man nämlich die in einem hängenden Tropfen auf dem Deckglas einer feuchten Kammer ausgebreiteten Amöben durch eine Mikropipette mit einem basischen Farbstoff, z. B. Toluidinblau oder Nilblausulfat, anpustet, tritt eine lokale, intensiv metachromatische Anfärbung auf. Mit einer ganzen Anzahl von bekannten metachromatischen Farbstoffen (siehe Tabelle bei Spek 1943) wurde dieses Phänomen überprüft und immer ein metachromatischer Farbeffekt erhalten. Die meisten verwendeten basischen Farbstoffe sind Indikatoren. Färbt man die Amöben z. B. mit Nilblausulfat A an, so erhält man eine rotviolett gefärbte Membran. Der Umschlagpunkt wird von einigen Autoren um pH 10 angegeben, liegt jedenfalls sicher über pH 8. Basische Substanzen von solchem pH sind

aber in Amöben noch nie nachgewiesen worden (Spek u. Chambers 1953). Chromotrope Substanzen lassen sich nach Spek auch leicht im Dunkelfeld analysieren. Ein Komplex von chromotroper Substanz und Neutralrot bzw. Janusgrün erzeugt im Ultramikroskop ein grünes oder rotes Streulicht. Die Membranen der Amöben zeigen diese typischen Leuchterscheinungen. Ebenso bleibt ein solcher Komplex in einer feuchten Kammer beim Durchleiten von Kohlensäure erhalten, während mit Indikatoren im Farbton der Base gefärbte Gewebe in der Regel sehr rasch nach der Behandlung mit Kohlensäure einen Farbumschlag nach der sauren Seite zeigen, da Kohlensäure im Gegensatz zu Mineralsäuren leicht an gefärbte Kolloide herantritt. Gegenüber Mineralsäuren sind auch nicht alle Komplexe beständig (s. S. 56). Ferner sind zur Bildung dieser metachromatischen Komplexe im Tierexperiment sehr starke Farbstoffkonzentrationen notwendig, die zwischen 0,2 und 0,5% liegen. Blasse metachromatische Anfärbungen werden zwar auch noch mit geringeren Konzentrationen erhalten, doch liegen sie immer noch weit höher als die Vitalfärbungskonzentrationen. Alle diese Kriterien einer echten Fällungsmetachromasie (Spek 1941) zeigten sich an den Membranen der *Amoeba proteus*. Es handelt sich also mit Sicherheit um eine chromotrope Substanz, wahrscheinlich um ein Mukoid. Diese Befunde über die Membranen von *Amoeba proteus* konnten noch an anderen Amöben bestätigt und ergänzt werden, z. B. an *Amoeba verrucosa* (Ehrenberg) und *Amoeba radiosa* (Stein). Hier ergaben sich besonders interessante Beobachtungen besonders im Dunkelfeld, auf die wir weiter unten noch zurückkommen müssen.

Diese Kriterien der metachromatischen Komplexe und das Verhalten der chromotropen Substanzen gegenüber der direkten Einwirkung der basischen Farbstoffe in vitalen und metachromasieerregenden Konzentrationen sollten auch an anderen Objekten überprüft werden. In der Literatur findet man die Ansicht weit verbreitet, daß Vitalfärbungen mit basischen Indikatoren einen Fehler verursachen und praktisch wertlos sind. Diese Theorie wurde an Modellsubstanzen erarbeitet und hat darum nur einen begrenzten Wert. Es ergibt sich allein aus der Praxis der Vitalfärbung heraus die Tatsache, daß sich chromotrope Substanzen auch durchaus anders verhalten können. So wird z. B. die Gallerthülle des Seeigelees mit Vitalkonzentrationen nie gefärbt, sondern es müssen schon stärkere Farbstofflösungen benutzt werden, um eine metachromatische Anfärbung zu erhalten. Kommt diese Reaktion auch mit sehr verdünnten Farbstoffen zustande, so kann trotz allem von einer Vitalfärbung keine Rede mehr sein, denn beim Zusammen-treten der Farbstoff- und Substratkomponente tritt eine Fällung auf, die das Substrat für lebenswichtige Prozesse innerhalb der Zelle nicht mehr verwendbar erscheinen läßt. Diese von Spek studierte Fällungserscheinung betrifft die Mucopolysaccharide. (Das Verhalten der Nucleinsäurefarbstoffkomplexe wurde noch nicht untersucht.) Wir wollen nicht verhehlen, daß auch andere Gründe für Farbumschläge möglich sind. Es ist ja leider über das Zustandekommen des metachromatischen Farbumschlags wenig gesichertes Material vorhanden. Dieses Problem wird in der Diskussion noch weiter erörtert. Auch eine Tatsache verdient besondere Beachtung. In der Literatur

finden sich häufig Angaben, in denen „metachromatische“ Färbungen mit blauen Farbstoffen beschrieben werden. Der metachromatische Farbton ist dann meist violett. Hier muß in Betracht gezogen werden, daß Granulen oder Vakuolen im Protoplasma den Farbstoff stark speichern können. In stärkeren Konzentrationen sind aber die blauen Farbstoffe schon an sich violett. Nur durch Testfärbungen, z. B. mit Agar, kann eine echte Metachromasie analysiert werden. Optische Phänomene, Farbänderungen durch Konzentrationsunterschiede, pH-Umschläge u. a. müssen von vornherein ausscheiden.

Der Niederschlag des metachromatisch gefärbten Komplexes, die dafür notwendigen Konzentrationen sowie die von Speck gefundenen näheren Umstände, z. B. das Verhalten des Komplexes gegen Kohlensäure und die Leuchterscheinungen im Ultramikroskop, sind in dieser Arbeit Gegenstand weiterer Versuche. Die allgemeine Gültigkeit dieser Ergebnisse von Speck sollten an möglichst zahlreichen Objekten überprüft werden. Wir wählten zunächst dazu die leicht darzustellende Colpidienhülle, an der schon Bresslau 1921 mit Viktoriablauf eine ausgeprägte Metachromasie feststellte. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden diese Befunde noch durch Untersuchungen an Ciliaten und Flagellaten ergänzt.

## 2. Die Bresslauschen Versuche

Bei seinen Untersuchungen über die Wirkung chemotherapeutischer Agenzien auf freilebende Protozoen fand E. Bresslau, daß bei Verwendung gewisser Farbstoffe und bestimmter Konzentrationen eigenartige Hüllen erscheinen. Er beobachtete beim Vermischen eines Tropfens der Colpidienkultur mit einem Tropfen Farblösung auf dem Objektträger, daß die Individuen heftige Bewegungen ausführen und bei einer Rotation um die eigene Achse mehr oder minder homogene Hüllen abscheiden. In schwächeren Farbstoffkonzentrationen oder bei geringerer Giftigkeit schlüpfen sie aus, um dann aber auch der Giftwirkung des Farbstoffs zu erliegen, sofern sie nicht in ein anderes Medium überführt werden. Die Notwendigkeit, mit Farbstoffen zu arbeiten, ergibt sich aus dem Brechungsindex der Hüllen, der mit dem des Wassers übereinstimmt. Ohne Hilfsmittel wird die Hülle also gar nicht sichtbar. Bresslau benutzte neben verschiedenen Farbstoffen auch Tusche und kolloidale Kohlelösungen. Die Hüllenbildung ist mindestens von drei Faktoren abhängig.

1. von der Art des Reizmittels oder des Farbstoffs,
2. von der Konzentration desselben,
3. von der Wasserstoffionenkonzentration der Kultur.

Durch ein Variieren dieser drei Faktoren erhält man die verschiedensten Hüllenformen. Untersuchungen über die chemische Struktur der Hüllen haben bereits zu gewissen Aufschlüssen geführt. Dieser Stoff gibt alle bekannten Eiweißreaktionen sowie die Molischreaktion auf Kohlehydrate. Es handelt sich demnach um ein Protein, an dessen Aufbau ein Kohlehydrat beteiligt ist. Bresslau nennt diese Substanz von hochgradigem Quellungsvermögen, die auf bestimmte Reize vom Protoplasma in Gestalt fein-

ster Tröpfchen nach außen abgeschieden wird, Tektin. Sehr bemerkenswert ist die ausgesprochene Metachromasie der Hülle. Bresslau führte die Farbumschläge auf die Farbbase zurück, die auf Grund auswählender Löslichkeit von der Hülle absorbiert wird. Es war also zunächst festzustellen, ob es sich bei den hier vorliegenden Färbungen der Hüllen um basische Reaktionen oder um eine Fällungsmetachromasie im Sinne Speks handelt.

### 3. Material und Technik

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Colpidien wurden aus einem Strohaufguß gewonnen und nach der von Oehler angegebenen Methode (Oehler 1920 und 1924) in Traubenzuckerlösung in einer zweigliedrigen Zucht unter Zugabe von *Bacterium coli* bzw. *subtilis* gehalten. Dabei erwies sich die Konzentration der Traubenzuckerlösung, die von Bresslau mit  $\frac{1}{2}$  bis 1% angegeben worden war, als zu hoch. Die dichteste Besiedlung und eine lange Haltbarkeit der Kulturen ergab sich mit Konzentrationen von 1:1000 bis 1:500. Als bestes Kulturmedium erwies sich eine Lösung von 1/100 Pepton und 1/100 Traubenzucker, in der die Colpidien prächtig gediehen. Leider konnte es für die vorliegende Arbeit keine Verwendung finden, da das Pepton (Witte, Rostock) die Hüllenbildung mit basischen Farbstoffen behindert. Die vorliegenden Colpidien wurden nach der von Bresslau angegebenen Methode bestimmt (Bresslau 1922). *Colpidium campylum* ist im Gegensatz zur Spezies *colpoda* viel schlanker und oft von beinahe zylindrischer Form. Das Verhältnis von Breite zu Länge ist 1:3, bei *Colpidium colpoda* 1:2. An letzterem sind in der Seitenansicht 20 bis 25 Wimperreihen bei mit Jod abgetöteten Tieren zu erkennen, bei *C. campylum* nur halb so viele. An den untersuchten Colpidien wurden 8 bis 10 Wimperreihen gezählt, und ebenso stimmte der Habitus mit *C. campylum* überein. Da die Hüllenbildung weitgehend von der Wasserstoffionenkonzentration abhängt und das Kulturmedium der Colpidien für die Hüllenbildung oft nicht günstig ist, ist eine Einstellung der Kulturen auf bestimmte pH-Werte notwendig. Puffergemische erweisen sich als unvorteilhaft, da die Hüllen der Colpidien gegen schwache Salzlösungen schon sehr empfindlich sind. Um trotzdem eine pH-Abstufung bei guter Hüllenbildung zu erhalten, wurde nach folgender Methode verfahren. In kleine Röhren wurden 2–4 cm<sup>3</sup> Kulturflüssigkeit und ein Tropfen Indikatorlösung gegeben. Aus einer dünnen Pipette wurde nun eine verdünnte Natriumbikarbonatlösung unter ständigem Schütteln der meist etwas sauer reagierenden Kultur (~pH 6) zugetropft. Eine Phosphatpufferreihe nach Sørensen mit dem gleichen Indikator diente zum Vergleich des Farbtons und zur Feststellung der pH-Werte. Als geeignete Indikatoren erweisen sich Bromkresolpurpur mit dem Umschlagsbereich von 5,2 bis 6,8, ferner Bromthymolblau mit einem Umschlagsbereich von 6,6 bis 7,6. Die so eingestellten Kulturen hielten ihre Werte mehrere Stunden, oft sogar Tage fest. Ein besonderer Einfluß auf die Versuche durch die Anwesenheit eines Indikators war nicht festzustellen.

Im Gegensatz zu den Versuchen an den Colpidien, die größtenteils im Winter gemacht wurden, sind die verwendeten Ciliaten und Flagellaten nicht in Kulturen gehalten worden, sondern vom Frühjahr bis zum Herbst 1952 und 1953 aus Teichen und Pfützen in der Umgebung von Rostock entnommen worden. Als Bestimmungsbuch für die Ciliaten wurde „Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeresteile. Ciliata“, begründet von Prof. Dr. Friedrich Dahl, benutzt. Es wurden folgende Ciliaten bearbeitet:

#### I. Ordnung Holotricha:

1. Unterordnung *Gymnostomata*:  
*Prorodon ovum* (Ehrenberg-Kahl),  
*Prorodon teres* (Ehrenberg),  
*Coleps hirtus* (O. F. Müller),  
*Loxodes rostrum* (O. F. Müller);
2. Unterordnung *Trichostomata*:  
*Paramaecium caudatum* (Ehrenberg);
3. Unterordnung *Hymenostomata*:  
*Frontonia leucas* (Ehrenberg).

#### II. Ordnung Spirotricha:

1. Unterordnung *Heterotricha*:  
*Spirostomum ambiguum* (Ehrenberg),  
*Bursaria truncatella* (O. F. Müller),  
*Stentor polymorphus* (Ehrenberg).

Ferner wurden noch verschiedene *Vorticella* sp. untersucht sowie von den parasitischen Formen *Opalina ranarum* (Ehrenberg) und aus den Larven des Mehlkäfers, *Tenebrio molitor*, die zylindrische *Gregarina polymorpha* (Hammerschmidt).

Für die Bestimmung der Flagellaten benutzten wir „Die Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz, Flagellata“, herausgegeben von Prof. Dr. A. Pascher, Prag 1914. Es wurden untersucht:

#### Ordnung Eugleninae:

- Phacus longicauda* (Ehrenberg),
- Phacus hispidula* (Eichw.),
- Euglena viridis* (Ehrenberg),
- Euglena deses* (Ehrenberg),
- Euglena velata* (Klebs),
- Euglena sanguinea* (Ehrenberg),
- Euglena proxima* (Dangeard),
- Euglena acus* (Ehrenberg),
- Euglena acutissima* (Lemmermann),
- Euglena oxyuris* (Lemmermann),
- Euglena caudata* (Hübner),

*Trachelemonas hispida* (Stein),  
*Trachelemonas volvocina* (Ehrenberg).

Ordnung *Peridineae*:

*Gymnodinium palustre* (Schilling),  
*Ceratium hirundinella* (C. F. Müller),  
*Peridinium tabulatum* (Ehrenberg).

Ordnung *Phytomonadinae*:

*Gonium pectorale* (Müller),  
*Volvox aureus* (Ehrenberg),  
*Pandorina morum* (Müller),  
*Eudorina elegans* (Ehrenberg),  
*Pleodorina* (Shaw),  
*Chlorogonium elongatum* (Dangeard),  
*Chlamydomonas Reinhardi* (Dangeard),  
*Chlamydomonas Ehrenbergii* (Goroschankin),  
*Chlamydomonas intermedia* (Chodat),  
*Chlamydomonas Braunii* (Goroschankin).

Ordnung *Chrysomonadinae*:

*Synura uvella* (Ehrenberg).

Ordnung *Chyptomonadina*:

*Chilomonas param.* (Ehrenberg).

Da die direkte Einwirkung verschiedener Farbstoffkonzentrationen und die dadurch hervorgerufenen metachromatischen Effekte an Ciliaten und Flagellaten untersucht werden sollten, gestalteten sich die Versuchsbedingungen recht einfach. Es wurde immer ein Tropfen Kulturlösung mit einem Tropfen Farbstoff verschiedenster Konzentration auf dem Objektträger vermischt. Die metachromatische Anfärbung der mucinartigen Substanzen kommt für gewöhnlich sofort beim Zusammentreffen mit dem Farbstoff zustande, während die metachromatische Färbung der nucleinsäurehaltigen Granulen und Kerne erst später auftritt. Den Nachweis einer echten „Fällungsmetachromasie“ führt man durch den Kohlensäureversuch. Wir benutzten einen gewöhnlichen Kippschen Apparat mit vorgeschalteten Waschflaschen. Die Kohlensäure wird beim Versuch in eine feuchte Kammer geleitet, in der sich im hängenden Tropfen die gefärbten Objekte befinden. Hierbei ist methodisch wichtig, daß die letzteren vor dem Versuch mit dest. Wasser abgespült werden, da in vielen Fällen bei stärkeren Konzentrationen der zur sauren Seite umschlagende überschüssige Farbstoff den metachromatischen Farbton überdeckt, so daß der Eindruck eines Umschlags der gefärbten chromotropen Substanz entsteht. Jeden dieser Versuche macht man am besten zweimal. Zunächst beobachtet man die gefärbten Objekte in der Farblösung und kontrolliert den Umschlag der letzteren. Bleibt nach dem Abspülen mit dest. Wasser und nochmaligem



Einleiten von Kohlensäure der metachromatische Farbton erhalten, dann handelt es sich mit Sicherheit um keine Indikatorreaktion, sondern um einen metachromatischen Komplex.

Bei den Färbungen mit den spezifischen Schleimfarbstoffen (Mucikarmin, Bestschersches Karmin usw.) wurden die Protozoen genau so behandelt, wie es für histologische Schnitte nach Romeis, Mikroskopische Technik 1948, gefordert wird.

#### 4. Farbstoffversuche an Colpidienhüllen

Bresslau und seine Mitarbeiter stellten durch mikrochemische Reaktionen fest, daß sich die Colpidienhülle aus einem Protein und einer Kohlehydratkomponente aufbaut. Damit steht das Tektin den echten Schleimen sehr nahe, und es war von vornherein zu erwarten, daß es sich hier um eine chromotrope Substanz handeln würde. Das Verhalten einer ganzen Anzahl basischer Farbstoffe wurde nun, analog den Versuchen an der Amöbenmembran, an diesen Colpidienhüllen studiert.

Die ersten Versuche wurden mit Viktoriablau 4 R ausgeführt. Für die Hüllenbildung gibt Bresslau eine Konzentration von 1 : 10.000 an. Da die Wasserstoffionenkonzentration zunächst unberücksichtigt blieb, war das Ergebnis negativ. Das pH der ungepufferten Kultur schwankt zwischen 5,2 und 6,0. Bei diesen Werten reicht auch bei stärkeren Konzentrationen der Farbstoffreiz nicht aus, die Hüllenbildung auszulösen. Erst bei Kulturen mit einem pH von 6,4 bis 6,8 tritt bei Verdünnungen von 1 : 10.000 die Tektinbildung auf. Die Hüllen haben ungefähr die von Bresslau für Viktoriablau angegebenen Formen. Die Tiere schlüpfen sofort aus. Zunächst ist bis auf die Nahrungsvakuole eine Anfärbung kaum festzustellen. Der Farbton der Hüllen ist deutlich violett, wenn auch etwas blaß. Bei Verdünnungen von 1 : 6000 sterben die Colpidien in ihren Hüllen langsam ab, wobei sie erst schneller, dann immer langsamer um ihre Achse rotieren. Das Tektin wird in ovalen voluminösen Hüllen abgeschieden. Der Farbton ist kräftig violett und besonders deutlich, da die Tiere nach dem Absterben im orthochromatischen Farbton dunkelblau, im Gegensatz zur violetten Hülle, erscheinen. Nach der Anwendung noch stärkerer Konzentrationen, 1 : 4000 bis 1 : 2000, sind die Tiere sofort tot. Der Farbton der Hülle, die das Tier nur noch wie ein schmaler Saum umgibt, zeigt einen Stich ins Violett-rötliche. Vielfach ist bei diesen hohen Konzentrationen überhaupt keine Hüllenbildung mehr wahrzunehmen.

Mit dem sehr ähnlichen Farbstoff Viktoriablau B sind noch stärkere Konzentrationen als bei Viktoriablau 4 R zur Färbung der Hüllen notwendig. Die besten Hüllenbildungen erreicht man bei einer Verdünnung des Farbstoffs von 1 : 500 bis 1500. Das ausgeschiedene Tektin hat einen Farbton, der nicht dem der reinen Farbbase entspricht. Die letztere ist himbeerrot, während die Hüllen sich in ihrer violetten Färbung prächtig gegen die orthochromatisch imbibierten Tiere abheben. Vielfach stellt die Hülle auch nur ein kleines gefaltetes Häutchen dar, das die Colpidien an ihrem Hinterende zurücklassen.

Zur Analysierung der metachromatischen Färbung wurde der Kohlensäureversuch gemacht. Natürlich kann man für diese Reaktion nur solche Indikatoren benutzen, die ungefähr im neutralen Bereich umschlagen. Ein Farbstoff, der seine Base erst bei pH 10 oder 11 bildet, schlägt nach dem Einleiten der schwachen Kohlensäure in die feuchte Kammer nur sehr schwer um. Es empfiehlt sich daher stets, wie oben bereits erwähnt, einen Kontrollversuch zu machen. In günstigem pH-Bereich ( $\sim$  pH 7) umschlagende metachromatische Farbstoffe und Indikatoren sind Nilblausulfat B, Neutralviolett und Neutralrot. Mit den drei genannten Farbstoffen werden durch Konzentrationen von 1 : 1000 bis 5000 die verschiedensten Hüllenformen gebildet. Mit Nilblausulfat B erhält man eine violette, eine orange mit Neutralrot und mit Neutralviolett eine braune metachromatische Anfärbung. Bei allen Farbstoffen schlägt der Farbton der Farbbase, wenn eine solche nach entsprechender Einstellung der Kultur vorliegt, sofort in den des dissoziierten Farbsalzes um, und der Farbton der Hüllen bleibt unverändert, obwohl in jedem Falle 20 bis 30 Min. lang Kohlensäure in die feuchte Kammer geleitet wurde.

Bei Janusgrün ist der Unterschied zwischen der orthochromatischen und metachromatischen Modifikation mit dem Auge kaum feststellbar. Eine verdünnte Lösung im Reagenzglas ist grünblau, der metachromatische Komplex mehr blau. Als Kriterium für einen metachromatischen Effekt kann aber das rote Streulicht gelten, das nach Spek bei chromotropen Substanzen im Ultramikroskop sichtbar ist, sofern sie frei bewegliche Teilchen haben. Janusgrün regt die Tiere im höchsten Maße zur Hüllenbildung an, und zwar im ganzen pH-Bereich, in dem die Colpidien existieren können. Diese Erscheinung beruht wohl auf der Giftwirkung des Farbstoffs. Die günstigste Konzentration ist 1 : 1000. Unter einem pH-Wert von 6,6 und über 7,5 wird die Hülle membranartig und hat den Charakter eines dünnen Häutchens. Bei einem pH von 7,3 erhält man eine schöne voluminöse, blau gefärbte Tektinhülle, die sich deutlich von dem orthochromatisch gefärbten Tier abhebt, das diffus mehr in einem grünlicheren Farbton tingiert ist.

Im Ultramikroskop ist das charakteristische rote Leuchten, das Kriterium eines metachromatischen Komplexes mit Janusgrün, nicht sichtbar. Die Hülle erscheint farblos. Lediglich am äußeren Rande zeigen sich zuweilen winzige rote Partikelchen. Kontrollversuche mit chromotropen Substanzen, z. B. Agar, zeigten ein rotes Leuchten. Lösungen der Farbbase geben diese Reaktion nicht.

Ein ähnliches Phänomen zeigt sich mit Neutralrot. Der metachromatisch gefärbte Komplex einer chromotropen Substanz mit Neutralrot ist im Dunkelfeld durch ein grünes Streulicht charakterisiert. Die mit Neutralrot behandelten Colpidienhüllen leuchten ebensowenig wie die Anfärbungen mit Janusgrün. In einigen wenigen Fällen wurde das Tektin stäbchenförmig ausgestoßen, ohne daß es zu einer Verquellung der Protrichocysten gekommen wäre. Bei starker Vergrößerung war dann ein schwacher grüner Leuchteffekt wahrzunehmen. Es kann sich bei dieser Erscheinung um einfarbiges Tyndall-Licht oder um eine Fluoreszenz der Farbstoff-Tektin-

Komplexe handeln. Auch mit Neutralrot wurden Kontrollversuche gemacht und dabei festgestellt, daß das Streulicht sehr variabel ist. Bei Versuchsreihen mit Agar sowie an Trichocysten zeigte sich in einigen Fällen ein prächtiges grünes, in anderen ein deutlich gelbes bis rotes Leuchten. Diese Erscheinung läßt sich durch Fluoreszenz schlecht erklären. Mit Natriumkarbonat eingestellte Kulturen, an denen Versuche mit Neutralrot gemacht wurden, neigten stark zur Kristallbildung. Die zuerst entstehenden winzigen Kriställchen zeigen ein grünes Leuchten im Dunkelfeld. Beim Anwachsen der Kristalle ging dasselbe in gelbes und dann in rotes Licht über. Die stärkste grüne Leuchterscheinung beobachtete Speck bei Arabylschwefelsäure. Mit Agar ist das Phänomen bedeutend schwächer, weil der Komplex leicht grob wird. Hieraus kann man schließen, daß der auftretende Lichteffect auf der Abbeugung des Lichts an metachromatischen Komplexen bestimmter Größenordnung beruht. Speck hatte vor Beginn meiner Arbeit folgende Umstände in Erwägung gezogen:

Er hatte festgestellt, daß feste Gele, selbst von so stark chromotropen Substanzen wie Agar, z. T. keinen metachromatischen Farbumschlag geben. Man kann festen Streifenagar von Kahlbaum in Toluidinblaulösung legen und erhält sogar eine orthochromatische Anfärbung und gar keine rote Niederschlagsbildung. Offenbar müssen also für die Entstehung der Fällungsmetachromasie freie Teilchen eines Sols vorliegen. Daß die Tektinsubstanzen der Protozoen chromotrop sind, war schon aus den Arbeiten Bresslaus zwar noch nicht mit Sicherheit, aber doch mit Wahrscheinlichkeit hervorgegangen. Andererseits konnte sich Speck selbst davon überzeugen, daß Tektinsubstanzen nach ihrer Ausscheidung feste Gele waren, wenn auch ihre Festigkeit an sich sich in keiner Weise mit der des Streifenagars vergleichen ließ. Man mußte also schon mit einer gewissen Beeinträchtigung der Fällungsmetachromasie durch die Gelstruktur von vornherein rechnen. Andererseits sind ja sehr wasserreiche Gele nie frei von freien Solteilchen, die dann wenigstens an der Oberfläche Fällungsmetachromasie geben könnten<sup>1</sup>. Je wasserreicher das ausgetretene Gel wird, um so besser muß es für die Reaktion mit dem Farbstoff geeignet werden. Das charakteristische grüne Streulicht, welches bei Zusatz von Neutralrot zu chromotropen Solen entsteht, und ebenso das rote Streulicht bei Zusatz von Janusgrün muß auch um so leichter entstehen, je mehr Solteilchen im chromotropen System vorhanden sind. Wieweit die Gelstruktur der ausgeschiedenen Tektine die Entstehung des Streulichtes beeinträchtigt, mußte empirisch festgestellt werden.

Eigene Versuche ergaben, daß es sich bei dem grünen Streulicht bei der Entstehung der Komplexe von chromotropen Substanzen und Neutralrot nicht um Fluoreszenz handelt. Es bleibt also zur Erklärung desselben nur übrig, daß das Licht an Teilchen bestimmter Dispersität abgelenkt wird. Auch das macht wahrscheinlich, daß das grüne Streulicht nur entstehen wird, wenn freie Teilchen eines chromotropen Sols vorhanden sind. Bei An-

<sup>1</sup> Über die Bedeutung der starken Hydratation der ausgetretenen Tektinsubstanzen für die Farbumschläge vgl. S. 51.

färbung der chromotropen Membran von kleinen Amöben schwärmen die Amikronen dieser Substanz nach vollzogener Fällungschromasie in ganzen Wolken aus und geben im Dunkelfeld ein wunderbar smaragdgrünes Streulicht. Dies scheint ein besonders idealer Fall zur Entstehung von grünem Streulicht zu sein (Spek u. Gillissen 1943). Wahrscheinlich ist das gallertig gequollene Tektin von solcher Struktur, daß die Beugung des Lichts an den Tektin-Farbstoff-Komplexen nicht zustande kommt. Wir werden weiter unten sehen, daß sich die Gallertsubstanzen der Flagellaten ähnlich verhalten und in der Diskussion diese Erscheinung noch weiter erörtern.

Neutralrot ist ein Azinfarbstoff mit sehr geringer Giftwirkung und ist deshalb wohl schwach hüllenbildend. Die Tektinhüllen sind durchweg dünnwandig und kapselartig und treten nur in einem schmalen pH-Bereich in Erscheinung. Die günstigsten Konzentrationen liegen bei 1:800 bis 1:2000. Der metachromatische Farbton ist orange und dem der Farbbase sehr ähnlich. Schwach hüllenbildend wirken auch Pyronin, Safranin und Neutralviolett. Setzt man einer verdünnten Lösung von Neutralviolett Natriumbikarbonat zu, so geht die violette Farblösung in den braunen Farbton der Farbbase über. Wenige Tropfen Citratnatronlaugepuffer (pH 6) bringen den Umschlag zum violettroten Farbsalz zustande. Neutralviolett ist daher für den oben beschriebenen Kohlensäureversuch ausgezeichnet geeignet.

Thionin ist in Lösung ein violetter Farbstoff. Die rote Farbbase stellt sich erst bei Zugabe von  $n/10$  Natronlauge ein. Sie ist in Wasser unlöslich und fällt sofort unter leichter Verfärbung aus. Der metachromatische Farbton ist dem der Farbbase sehr ähnlich. Der Farbstoff wurde in Konzentrationen von 1:1000 bis 1:2000 in einem pH-Bereich von 6,6 bis 7,3 verwendet. Bei sehr verdünnten Farbstofflösungen kann man die Tiere noch durch einen kleinen Kunstgriff zur Tektinabscheidung zwingen. Durch Erwärmen des Farbstoffs auf 35° wirkt die Temperatur als hüllenbildender Reiz, so daß die Komplexbildung dennoch zustande kommt. Vorherige Hitzefixierung und nachträgliches Anfärben der Hüllen mit Thionin waren erfolglos. Die gefärbten und durch Erwärmen abgetöteten Tiere zeigen eine diffuse blauviolette Plasmafärbung. Die Kerne erscheinen dunkelrot und werden durch das Cytoplasma ausgestoßen. Auf die metachromatische Färbung verschiedener Protozoenkerne werden wir weiter unten noch eingehen.

Toluidinblau ist wie das Thionin ein Thiazinfarbstoff. Die metachromatisch gefärbten Hüllen sind kirschrot gefärbt. Die Farbbase bildet einen violetten Niederschlag, ist also in diesem Falle dem undissoziierten Farbstoffmolekül im Farbton nicht ähnlich. Die Colpidien schlüpfen bei Konzentrationen von 1:5000 aus kräftig gefärbten voluminösen Hüllen, die bei weiterer Verdünnung des Farbstoffs immer blasser werden, um ungefähr bei 1:30.000 überhaupt nicht mehr zu erscheinen. Bei allen Versuchen mit basischen Farbstoffen war die schon von anderen Autoren beobachtete Tatsache auffallend, daß die Colpidien in Kulturen mit pH-Werten von 7,0 bis 7,6 nach der Tektinausscheidung rasch absterben, während

sie bei niederem pH (5,2–5,6) bei gleicher Farbstoffkonzentration viel länger leben und normale Bewegungen zeigen.

Die Colpidienhüllen sollten nun auch einmal mit nichtmetachromatischen Farbstoffen überprüft werden. Das von Spek untersuchte Brillantkresylviolett zeigt weder an der Amöbenmembran noch mit chromotropen Substanzen einen metachromatischen Effekt. So fielen die Versuche an der Colpidienhülle auch negativ aus. Es wurde nach dem Einwirken des Farbstoffs überhaupt keine Tektinbildung festgestellt. Überraschenderweise ergab sich bei späteren Versuchen mit einem ganz anderen Farbstoff, der ebenfalls mit Brillantkresylviolett bezeichnet war, eine prächtige Anfärbung chromotroper Substanzen. Es handelt sich hier um zwei in ihren Eigenschaften völlig verschiedene Farbstoffe, die beide von der Firma Hollborn, Leipzig, stammen. Bei der Untersuchung mit einem Vergleichsspektroskop zeigten sich auch die Spektren stark unterschiedlich. Das nichtmetachromatische BCV schlägt in schwach alkalischer Lösung (pH 7,6) sehr langsam von Blau nach Rosa um. (Weitere Mitteilungen über diesen Farbstoff bei Spek 1940.) Das metachromatische BCV hat mit dem vorigen die langsame Art des Umschlagens in die rosa Farbbase gemein. Setzt man diesen Farbstoff in Pufferlösungen von pH 8 bis 10,4 an, so zeigt sich bei 10,4 ein sofortiger Umschlag in die rosa Farbbase. Im Verlauf einiger Tage schlägt ein Röhrchen nach dem anderen um. Der Beginn des Umschlags liegt dann etwa bei 9,2, und bei einem pH von 9,5 liegt die rosa Farbbase vor. Letztere ist in Wasser schwer löslich und setzt sich als Niederschlag zu Boden. Die überstehende Flüssigkeit hat einen schwach rosa Farbton. Bei Versuchen mit chromotropen Substanzen treten die Unterschiede der beiden Farbstoffe besonders deutlich in Erscheinung. In einer 1%igen Agarlösung verändert sich nach der Zugabe eines Tropfens BCV der blaue Farbton nicht. Das metachromatische Brillantkresylviolett verfärbt sich augenblicklich rotviolett. Dieser Farbton ändert sich auch nicht, wenn man in diese Lösung 1 n Salzsäure zutropfen läßt, bis ein pH von 1 erreicht ist. Weiterhin unterscheiden sich beide Farbstoffe durch ihre Fluoreszenz. BCV fluoresziert grün, das metachromatische außerordentlich stark rot. Diese rote Fluoreszenz tritt besonders stark im Ultramikroskop in Erscheinung, während im Fluoreszenzmikroskop bei vorgeschalteten UV-Filtern der Effekt schwächer ist. Das Erregerlicht liegt also mehr im Bereich langwelligerer Strahlen. Sehr ausgeprägt ist die Metachromasie dieses rotfluoreszierenden Farbstoffes. Mit Verdünnungen von 1:1000 bis 5000 werden große rote Hüllen beobachtet, worin die violett gefärbten Tiere ihre typischen Drehbewegungen ausführen.

Genau die gleichen metachromatischen Hüllenbildungen erhält man mit dem dem BCV nahe verwandten Farbstoff Kresylechtviolett.

Auf die einzelnen Ergebnisse der Vitalfärbung mit den verwendeten Farbstoffen soll hier nicht weiter eingegangen werden. Die unterste Grenze der Farbstoffkonzentration einer echten Vitalfärbung liegt aber mit den relativ ungiftigen Farbstoffen, wie z. B. mit Neutralrot, bei 1:50.000. Andere Farbstoffe, wie z. B. Janusgrün, wirken einwandfrei vital erst bei

1 : 100.000 bis 200.000. Dies gilt für einen pH-Wert um 7, der hier aber nur interessiert, da die Hüllenbildung im wesentlichen in diesem Bereich zustande kommt. Mit diesen Vitalkonzentrationen wurde aber in keinem Falle eine metachromatische Färbung erzielt. Das ist sehr plausibel, denn in einem vitalen Medium ist es für die Colpidien nicht erforderlich, sich durch den Ausstoß der Protrichocysten gegen den Farbstoff zu schützen. Es

Farbstoff-Tabelle.

Farbstoff	Metachr. Farbton	Hüllenbild	Verdünnung	pH-Bereich
Janusgrün G . . . . .	blauviolett	× × × × ×	1:1000— 1:10.000	5,4—8,0
Viktoriablau 4 R . . . . .	violett	× × ×	1:4000— 1:10.000	6,4—7,6
Viktoriablau B . . . . .	blauviolett	× × ×	1:500— 1:1500	6,4—7,6
Neutralrot . . . . .	orange	×	1:800— 1:2000	6,6—7,1
Nilblau A . . . . .	rotviolett	× × × ×	1:5000— 1:10.000	6,4—7,6
Nilblau B . . . . .	blauviolett	× × ×	1:1000— 1:5000	6,6—7,4
Toluidinblau . . . . .	kirschrot	× × × ×	1:1000— 1:10.000	6,4—7,6
Kresylechtviolett . . . . .	rot	× ×	1:1000— 1:2000	6,4—7,2
Pyronin . . . . .	orange	×	1:1000	7,2
Safranin . . . . .	gelblichbraun	×	1:1000— 1:2000	6,8—7,2
Brillantkresylviolett . . . . .	—	—	—	—
Brillantkresylviolett . . . . .	rotfluoreszierend	× × × ×	1:1000— 1:5000	5,6—7,8
Thionin . . . . .	rotviolett	× ×	1:1000— 1:5000	6,7—7,4
Neutralviolett . . . . .	bläßbraun, braun	×	1:1000— 1:5000	6,7—7,4
Aethylviolett . . . . .	rotviolett	× ×	1:2000— 1:15.000	6,6—7,3

× × × × × sehr stark Hüllen bildend; × × × × stark; × × × mittel;  
× × schwach; × sehr schwach; — keine Hüllenbildung.

besteht aber auch die Möglichkeit, daß für eine Fällungsmetachromasie das Farbstoffangebot nicht groß genug ist. Dieser Fall wird in der Theorie der metachromatischen Färbung noch Berücksichtigung finden.

Die Ergebnisse der Färbung mit metachromatischen Farbstoffen an der Colpidienhülle seien hier noch einmal übersichtlich in einer Tabelle zusammengestellt.

Zu den hohen Farbstoffkonzentrationen in dieser Tabelle müssen wir noch bemerken, daß die verwendeten Lösungen in Wirklichkeit nur halb



so stark sind, denn durch das Mischen mit einem gleich großen Tropfen Kulturlösung sinkt die Konzentration z. B. der in der Tabelle angegebenen Neutralrot-Lösung von 1 : 2000 auf 1 : 4000.

### 5. Metachromasieerscheinungen an Trichocysten

Zwischen den Protrichocysten Bresslaus und den typischen Trichocysten gibt es alle Übergänge. Es war also auch zu erwarten, daß sich die spezialisierten Spindel- und Nesselkapseltrichocysten metachromatisch anfärben würden. Mit gewöhnlichen Vitalkonzentrationen, die z. B. für Neutralrot im Bereich von 1 : 500.000 bis 1 : 50.000 liegen, läßt sich an *Paramaecium caudatum* (Ehrenberg) derartiges nicht nachweisen. Hierzu benötigt man Farblösungen von mindestens 1 : 15.000. Bei den folgenden Untersuchungen stimmten die Ergebnisse der Färbungen von *Paramaecium* und *Frontonia leucas* (Ehrenberg) überein, so daß sie hier zusammen besprochen werden können. Die gerade noch bei der Grenzkonzentration für Neutralrot, Neutralviolett und Thionin (1 : 15.000) ausgestoßenen Trichocysten zeigen einen blassen metachromatischen Farbton, der sich bei der Anwendung stärkerer Lösungen immer mehr vertieft. Vielfach verquellen dann die Trichocysten und bilden scheinbar eine echte Hülle (vgl. auch Bresslau 1922/23). Alle in der Tabelle angegebenen Farbstoffe wurden an diesen Objekten überprüft, und es zeigte sich überall das Bild einer metachromatischen Reaktion mit der schon bekannten Ausnahme, dem grünfluoreszierenden Brillantkresylviolett. Hier wurden die orthochromatisch (blau) gefärbten Trichocysten erst sehr spät, kurz vor dem Tode der Tiere, ausgestoßen. In der feuchten Kammer unter der Einwirkung der Kohlensäure blieben die mit Neutralrot, Nilblau und Neutralviolett erzielten Metachromasieerscheinungen unverändert. Für die Dunkelfeldversuche empfiehlt es sich, die Paramaecien oder Frontonien gründlich mit dest. Wasser zu waschen, um wenigstens die Kultur annähernd frei von Bakterien zu machen, die nämlich ebenfalls mit Janusgrün vielfach Tyndalleffekte hervorrufen und so ein an *Paramaecium* beobachtetes Phänomen verdecken. Mischt man mit Aqua dest. gewaschene Paramaecien mit Janusgrün 1 : 10.000 und legt vorsichtig ein Deckglas auf, so sieht man zunächst die sofort ausgestoßenen und rotgefärbten Trichocysten um das Tier oder in der Nähe desselben liegen. Dann erscheint aus dem Tier heraus plötzlich eine Wolke feinsten rot leuchtender, kleiner Partikelchen, die tanzend als großer roter Hof das Tier umgeben (siehe Abb. 1) und sich rasch in dem umgebenden Medium verteilen, so daß diese Erscheinung schon nach einiger Zeit nicht mehr zu bemerken ist. Auch im Hellfeld sind diese kleinen metachromatisch gefärbten Teilchen sichtbar. Augenscheinlich werden durch das Platzen der Pellicula noch andere chromotrope Substanzen befreit, die dann sofort mit dem freien Farbstoff reagieren und das glutrote Leuchten in auffälliger Weise erzeugen. Betrachtet man eine gefärbte Trichocyste bei stärkerer Vergrößerung im Ultramikroskop, so kann man feststellen, daß die chromotropen Substanzen am Rande liegen müssen; denn gerade dieser strahlt das rote Leuchten aus, während das Innere optisch leer erscheint

(siehe Abb. 2). Mit Neutralrot erhält man das gleiche Bild im grünen Farbton, nur nicht mit der gleichen Regelmäßigkeit und Intensität.

Bei den Heterotrichen färben sich nach dem Ausstoß die so weit verbreiteten trichocystenähnlichen dunklen Stäbe des Ektoplasmas. Mit Neutralrot waren dazu Konzentrationen von 1 : 20.000, mit Janusgrün sogar nur solche von 1 : 30.000 notwendig. Auch diese Stäbe verquellen zu einem hüllenartigen Gebilde um das Tier und zeigen im Dunkelfeld die gleichen Erscheinungen, wie sie oben an den Trichocysten beschrieben wurden. Das ist z. B. bei *Bursaria truncatella* (O. F. Müller) der Fall.

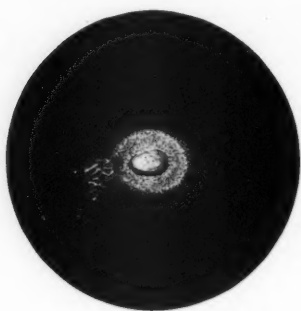


Abb. 1. *Paramaecium caudatum*, gefärbt mit Janusgrün 1 : 10.000, im Dunkelfeld. In der Mitte das *Paramaecium* mit den austretenden chromotropen Substanzen, am Rande die Trichocysten.  
Ok. 10, Obj. 3.

*Spirostomum ambiguum* (Ehrenberg) verhält sich ähnlich, nur werden Stäbchenbildungen nicht beobachtet. Die Hülle, die z. B. mit Kresylechtviolett oder Nilblau B 1 : 10.000 gebildet wird, ist metachromatisch gefärbt und läßt keine morphologischen Differenzierungen erkennen. Die Protrichocysten verquellen ebenso wie bei der Colpidienhülle, und auch sonst zeigen sich ähnliche Verhältnisse. Z. B. kann man auch hier beobachten, wie die Spirostomen Anläufe nehmen und mit kräftigem Wimperschlag gegen die Hüllenwandung stoßen. Bei schwachen Gebilden dieser Art gewinnen sie das Freie, in kompakteren Hüllen kann man noch lange die bekannten Torsionsbewegungen beobachten, bis die Tiere langsam absterben. Ebenso sind die Bilder im Dunkelfeld die gleichen wie bei der Colpidienhülle. Sie erscheinen farblos, bläulich oder rot mit Janusgrün.

An Stentoren stand uns leider nur der 1–2 mm frei schwimmende und anscheinend keine Gehäuse bildende *Stentor polymorphus* zur Verfügung, so daß die sicher recht interessanten Untersuchungen der Gallertgehäuse von *Stentor roeseli* und *mülleri* auf einen späteren Zeitpunkt verschoben werden mußten. Protrichocysten sind aber bei *Stentor* vorhanden, die mit den angeführten basischen Farbstoffen kontinuierliche metachromatisch gefärbte Säume um das Tier bilden. Besonders auffällig färbte sich auch in der Zone des Peristoms die Basis der Membranellen. Mit dem rotfluoreszierenden BCV entstehen dicke rotgefärbte Wülste, die der Spiralwindung der Membranellen folgen.

Die Nesselkapseltrichocysten der *Gymnostomata* verhalten sich färbend genau so wie die Pro- und Spindeltrichocysten. In einer Kultur stand uns eine Population von *Prorodon*-Arten zur Verfügung, die zum größten Teil aus *Prorodon teres* und *ovum* (Ehrenberg-Kahl) bestand. Mit Nilblausulfat B 1 : 5000 erscheinen sofort violette Hüllen, die aus Nesselkapsel- und verquollenen Protrichocysten bestehen. Gegenüber der Kohlensäure

verändert sich der Farbton nicht. Wie Nilblausulfat B reagieren auch die anderen basischen Farbstoffe. Auffällig war das Verhalten gegenüber dem Neutralrot. Mit diesem Farbstoff 1 : 20.000 waren die Trichocysten nicht gefärbt, sondern lagen als stark lichtbrechende Stäbe neben den Tieren. Auch mit konzentrierteren Lösungen veränderte sich das Bild nicht wesentlich außer einer schwachen Absorption: im orthochromatischen Farbton. Auch hier ist also die Erscheinung ausgeprägt, die schon an den Colpidien und zum Teil an anderen Ciliaten gefunden wurde, daß nämlich Neutralrot recht schwer metachromatische Komplexe bildet. Das äußert sich besonders in den hohen Konzentrationen, die oft zur Hüllenbildung notwendig sind (Colpidien z. T. 1 : 800). Mit Janusgrün leuchten Hüllen und Trichocysten im Dunkelfeld rot.

Weiter wurden noch untersucht *Loxodes rostrum* (O. F. Müller) und *Coleps hirtus* (O. F. Müller). *Loxodes* reagiert auf die basischen Farbstoffe, die in Konzentrationen von 1 : 10.000 bis 20.000 angewendet wurden, äußerst empfindlich. Auch in noch schwächeren Lösungen platzen die Tiere, und das Protoplasma fließt aus. Metachromatische Anfärbungen oder Hüllenbildungen wurden in keinem Falle nachgewiesen, obwohl in der Literatur (z. B. Kahl 1930) Protrichocysten für *Loxodes* angegeben sind. Dagegen werden bei *Coleps* die wenigen Trichocysten der Schlundwandung ausgestoßen. Es sind etwa  $20\mu$  lange stäbchenartige Gebilde, im Dunkelfeld finden sich ebenfalls wie bei *Paramaecium* mit Janusgrün winzige rot leuchtende Partikel, die sich durch das Deckglasaufliegen rasch verteilen. Mit Neutralrot färben sich im Innern des Tieres die verschiedensten Elemente im Farbton der sauren Seite.

Weitere Versuche an verschiedenen *Vorticella* sp. und parasitischen Formen, z. B. *Opalina ranarum* (Ehrenberg), und an der zylindrischen *Gregarina polymorpha* verliefen ergebnislos. Wenigstens werden zu einem beliebigen Zeitpunkt durch Farbstoffe keine Tektinbildungen beobachtet. *Opalina* bildet im Frühjahr zur Laichzeit der Frösche die sogenannten Infektioncysten. In einem Falle bemerkten wir bei der Sektion von *Rana temporaria* im Enddarm frisch gebildete Infektioncysten, die mit basischen Farbstoffen metachromatisch reagierten. Werden diese Cysten mit dem Kot der Frösche ausgeschieden, dann verhärtet die Cystenhülle, so daß der Farbstoff nicht eindringen kann. Es ist anzunehmen, daß bei der Cystenbildung mehrere Hüllen abgeschieden werden, so wie es z. B. Bresslau für *Tillina magna* angegeben hat. Die inneren Hüllen entstehen unter ganz anderen Bedingungen, z. B. ohne Gegenwart von Wasser. Eine metachromatische Anfärbung von Tektinsubstanzen kommt aber stets nur nach dem Austritt in das umgebende Medium bzw. nach ihrer Quellung zustande. Eine Tatsache, von der man sich leicht bei der Trichocystenfärbung überzeugen kann, wenn man die Zugabe des Farbstoffs zu einem Tropfen Kulturlösung durch das Mikroskop beobachtet. Hier wird deutlich, daß die Trichocysten zunächst ungefärbt ausgestoßen werden, dann aber nach der Quellung den Farbstoff sehr rasch aufnehmen. Von dieser Betrachtung aus ist es verständlich, daß Dauercysten den Farbstoff nicht aufnehmen, darum keine metachromatische Färbung zeigen, aber doch aus Tektinsubstanzen gebildet

werden. Zu den gleichen Ergebnissen kommt man auch durch Modellversuche. In einer verdünnten Agarlösung lassen sich metachromatische Umschläge schön studieren, während die in einer konzentrierteren Lösung vorhandenen Brocken im Mikroskop nur am Rande eine Färbung erkennen lassen, da sie noch nicht ausgequollen sind. Ja, dieses unterschiedliche Verhalten von Agar-Sol und Agar-Gel geht sogar soweit, daß mit letzterem orthochromatische Färbungen erhalten werden können (Spek 1940).

## 6. Metachromasieerscheinungen an den Gallertsubstanzen der Flagellaten

Sehr schöne Metachromasieerscheinungen werden auch an den Gallerthöfen der Flagellatenkolonien erhalten. So kann man an *Gonium pectorale* (Müller), *Pandorina morum* (Müller) und *Eudorina elegans* (Ehrenberg) feststellen, daß auch hier die gleichen Konzentrationen geboten werden müssen wie bei der Trichocystenfärbung. Bei letzterer kann man nämlich den Einwand machen, daß die hohen Konzentrationen des Farbstoffs nur als Reiz zum Ausstoß der Tektinsubstanzen dienen und in Wirklichkeit diese starken Farblösungen für die metachromatische Färbung gar nicht notwendig sind. Es zeigt sich aber hier an den freien Gallertsubstanzen der Kolonien ebenfalls, daß für die metachromatischen Reaktionen bei allen in der Tabelle aufgeführten Farbstoffen Konzentrationen von 1 : 50.000 bis 10.000 benötigt werden.

An großen *Gonium*-Kolonien wurde beobachtet, daß die gefärbte Gallertmasse, in der die einzelnen Flagellatenindividuen eingebettet liegen, durch die Farbstoffeinlagerung eine außerordentlich feste Konsistenz annimmt, die mit einem schneidbaren Gel zu vergleichen ist. Durch Deckglasdruck kann man die Einzelindividuen von der Schleimhülle trennen, ohne letztere zu zerstören. Diese festen Gallertverbände geben im Dunkelfeld mit Janusgrün und Neutralrot keine positiven Reaktionen, sondern es zeigen sich wie an den Colpidienhüllen alle Übergänge von farblosen Hüllen bis zu roten bzw. grünen Leuchterscheinungen. Dagegen werden mit diesen Farbstoffen an *Pandorina* und *Eudorina* leuchtend rote und grüne Höfe erhalten. Es treten nämlich, ähnlich wie bei *Paramaecium*, chromatrophe Substanzen bei der Einwirkung des Farbstoffs aus, die sich kreisförmig um die Gallertmasse herumlegen. Abb. 3 zeigt eine mit Neutralviolett gefärbte *Pandorina*. Der metachromatische Farbton der Gallerthülle ist ein kräftiges Braun, während der die Hülle umgebende Hof etwas blasser erscheint, das darauf zurückzuführen ist, daß dieser Rand außerordentlich stark gequollen ist und die chromatropen Substanzen nicht in der Konzentration vorhanden sind wie in dem eigentlichen Gallertlager. Außerordentlich schöne metachromatische Anfärbungen kann man auch mit Toluidinblau (rot), Thionin (rot) und Nilblau B (violett) erhalten. Durch Kohlensäureeinwirkung wird der Farbton nicht verändert. Vielfach werden auch von den Einzelindividuen selber innerhalb des Gallertverbandes durch die Farbstoffeinwirkungen schwach metachromatisch gefärbte Schleimhüllen ausgeschie-



Abb. 2. Trichocysten von *Paramecium caudatum* im Dunkelfeld, gefärbt mit Janusgrün 1 : 10.000. Die chromotropen, rot leuchtenden Substanzen liegen in der Randzone. Ok. 15, Obj. 90.

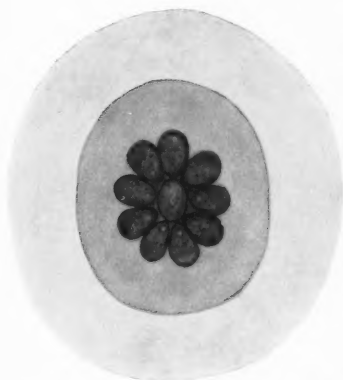


Abb. 3. *Pandorina morum*, gefärbt mit Neutralviolett 1 : 5000. Die schwächer metachromatisch gefärbte Randzone wurde von austretenden chromotropen Substanzen gebildet. Ok. 10, Obj. 20.

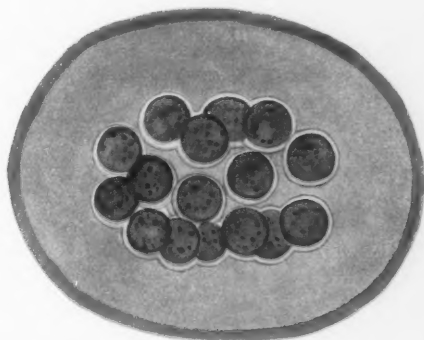


Abb. 4. *Eudorina elegans*, gefärbt mit Toluidinblau 1 : 15.000. Die Randzone des Verbandes ist stärker, die ringförmigen Höfe um die Einzelindividuen sind nur ganz schwach metachromatisch gefärbt. Ok. 10, Obj. 20.

-

6

6

1

15.13



den, wie aus unserer Abb. 4 ersichtlich ist. Diese mit Toluidinblau gefärbte *Eudorina*-Kolonie zeigt einen sehr intensiv gefärbten Ring, der auch am ungefärbten Tier stärker lichtbrechend erscheint als die nach innen anschließende Gallertmasse. Eine ähnliche Erscheinung findet man an den Schleimhüllen der Gymnodinien (Abb. 5). Auch hier ist zum Teil eine kräftiger gefärbte Randzone der Hülle nachgewiesen worden, was auf einen vermehrten Gehalt an Mucopolysacchariden zurückzuführen ist.

Bei allen Färbungen, bei denen der Farbstoff immer unmittelbar auf das Tier einwirkt, sind, wie wir schon ausgeführt haben, zum Nachweis der chromotropen Substanzen ziemlich hohe Konzentrationen erforderlich. Das ändert sich nach der Fixierung. Wir benutzten meistens eine 10%ige Formollösung oder das Bouin'sche Gemisch. In fixierte und gründlich gewaschene Kolonien dringt der Farbstoff außerordentlich leicht ein, weil durch die Vorbehandlung die die metachromatische Färbung in vivo hemmenden Faktoren fortfallen. So gelingt es jetzt mit bedeutend geringeren Konzentrationen, metachromatische Effekte zu erzielen. Die gleiche Erscheinung ist auch an den Trichocysten der Ciliaten zu beobachten.

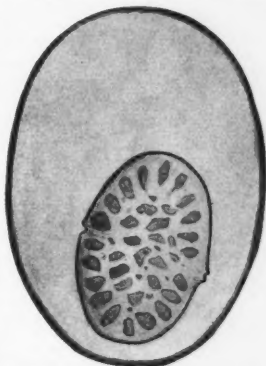


Abb. 5. *Gymnodinium pallidum*, gefärbt mit Toluidinblau 1:5000. Der Flagellat befindet sich in der metachromatisch rot angefärbten Hülle. Ok. 10, Obj. 40.

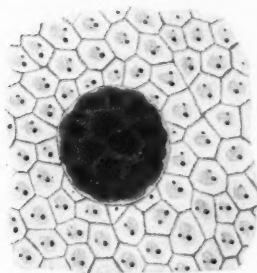


Abb. 6. *Volvox aureus*, gefärbt mit metachromatischem Brillantkresylviolett 1:10.000. Der Ausschnitt zeigt die stark hervortretende Gitterung und die Tochterkugel mit schwacher Hüllenbildung.

Auch *Volvox aureus* (Ehrenberg) war ein interessantes Objekt für unsere Studien. Mit Toluidinblau 1:15.000 nimmt *Volvox* sofort einen prächtigen roten Farbton an. Besonders deutlich und ganz intensiv färbt sich die scharf abgegrenzte Membran, die die Kolonie umgibt, sowie die netzig-wabige Felderung, in der die Einzelindividuen sitzen. Die Tochterkugeln bilden Schleimhöfe, die sie umgeben und die ebenfalls einen kräftigen metachromatischen Farbton aufweisen. Sie selbst speichern den Farbstoff im orthochromatischen Farbstoff sehr stark und werden dadurch nach kurzer Zeit dunkel. Es ergibt sich somit ein Bild, wie es unsere Abb. 6, hier mit dem rotfluoreszierenden BCV erhalten, zeigt. Der zwischen den Gittern liegende Grundton der Färbung wird durch die übrige Gallertmasse, in der die Flagellaten eingebettet liegen, erhalten. Genau die gleichen Ergebnisse in ihren metachromatischen Farb-

tönen liefern alle anderen Farbstoffe. Es ist dabei ganz gleich, ob man in saurem (pH 4) oder alkalischem (pH 8) Milieu färbt. Mit nicht metachroma-

tischen Farbstoffen, wie auch mit dem grünfluoreszierenden BCV, werden rein orthochromatische Anfärbungen erhalten. Im Dunkelfeld wird auch das Verhalten der im Innern des Gallertmantels sich befindenden, wenig konsistenten Gallerte klar. Drückt man nämlich mit Janusgrün behandelte *Volvox*-Kolonien mit einer Präpariernadel so, daß die Randmembran und der darunter liegende Gallertmantel platzen, dann tritt aus der Mitte ein leuchtend rotes Feld winziger Partikelchen — ein Zeichen, daß hier eine solartige Substanz vorgelegen hat, die in dieser Weise mit dem Farbstoff reagiert —, wie es auch Spek an der Amöbenmembran zeigen konnte (Spek 1945). Der die Flagellaten einbettende Gallertmantel erscheint farblos, was aber nichts gegen seine Eigenschaft als chromotrope Substanz besagen will. Sehr stark rot leuchten die Gittermembranen und die Hüllmembran des Randes. Mit Neutralrot erhält man die gleichen Leuchterscheinungen im grünen Farbton.

Die Überprüfung dieser chromotropen Substanzen durch den Kohlensäureversuch hat zunächst zu Irrtümern geführt, dergestalt, wie es bereits oben in dem Abschnitt Material und Technik erwähnt wurde. Überschüssiger Farbstoff ist also unbedingt zu entfernen, um eine ganz genaue Kontrolle des metachromatischen Farbtons zu gewährleisten. Durch die Einwirkung der Kohlensäure schrumpfen die Kolonien etwas, ohne ihren Farbton zu ändern.

Vitalfärbungen in Farblösungen von 1:100.000 bis 50.000 lassen alle metachromatischen Effekte im Hellfeld vermissen. Die Gallertsubstanzen nehmen den Farbstoff nur schwach im orthochromatischen Farbton auf. Im Dunkelfeld zeigen die Gittermembranen und die Hüllmembran, wie zu erwarten, keine Leuchterscheinungen. Vitalfärbungen mit Nilblausulfat führen zu einer Reduktion des Farbstoffs, die das sofortige Absterben der Kolonien zur Folge hat.

Metachromatische Anfärbungen wurden auch an einer Kolonie beobachtet, die sehr große Ähnlichkeit mit der von Chatton beschriebenen *Pleodorina* hat (Pascher 4, 1927). Da aber nur wenige Exemplare zur Untersuchung vorlagen, soll der Hinweis, daß auch die Gallerten dieser Kolonie aus einer chromotropen Substanz bestehen, hier genügen.

Bei den übrigen von uns bearbeiteten phytomonadinen Formen haben wir recht unterschiedliche Ergebnisse erhalten. Während sich bei *Chlamydomonas Braunii* (Goroschankin) auch an den vegetativen Zellen metachromatische Anfärbungen zeigen, konnten wir an den anderen untersuchten Flagellaten nur Anfärbungen ihrer Teilungs- und Palmellenstadien feststellen. Der Farbstoff dringt in diese Gallertlager z. B. von *Chlamydomonas intermedia* (Chodat) langsam ein und färbt sie vom Rande her ganz metachromatisch an. Ebenso verhalten sich die Teilungsstadien von *Chlamydomonas Ehrenbergii* (Goroschankin) und *Chlamydomonas Braunii*. Hier befinden sich zwei abgekugelte Flagellatenkörper nach dem Teilungsvorgang in einer runden, sie umgebenden Hülle. Diese nimmt außerordentlich leicht den Farbstoff an, d. h. es genügen schwache Konzentrationen, die aber immer noch stärker als die Vitalkonzentration sind. Auch die gloeocystisartigen Stadien, bei denen mehrere

mit einer Hülle umgebene Flagellatenprotoplasten in einem gemeinsamen Gallertlager ruhen, verhalten sich so. Im Dunkelfeld leuchten mit Janusgrün bzw. mit Neutralrot wenigstens die Palmellen rot oder grün, während die im Hellfeld metachromatisch gefärbten Teilungs- und Gloeocystisstadien im Ultramikroskop kein Tyndall-Leuchten zeigen und nur durch den äußeren lichtbrechenden Rand der Hülle überhaupt wahrzunehmen sind. Hier muß auch erwähnt werden, daß diese Färbungen zum großen Teil nur im Frühjahr gelingen und daß sie im Herbst an den gleichen Objekten negativ ausfallen. Man kann schon an den ungefärbten Hüllen leicht den Unterschied erkennen. Die im Herbst gebildeten sind viel stärker lichtbrechend und haben einen glasartigen Charakter. Sie scheinen völlig oder sehr stark dehydratisiert zu sein, während die Frühjahrshüllen eine mehr solartige Konsistenz zeigen.

*Chlamydomonas Braunii* (Goroschankin) zeichnet sich im vegetativen Zustand durch eine basal und lateral vom Protoplasten abstehende Membran aus. In diesem Zwischenraum treten nun mit basischen Farbstoffen metachromatische Färbungen auf. Es ist dabei nicht eindeutig zu unterscheiden, ob hier eine chromotrope Substanz eingelagert ist, oder ob sich die Membran von der Innenseite her anfärbt. An diesen Flagellaten läßt sich besonders gut das Vitalitätskriterium nach metachromatischen Färbungen studieren.

Sobald eine metachromatische Reaktion, und sei es mit geringsten Konzentrationen, zustande kommt, ist das Verhalten der Flagellaten nicht mehr als einwandfrei vital zu bezeichnen. Meistens erfolgt eine starke Rotation um die eigene Achse, bis dann völlige Bewegungslosigkeit eintritt. Mit der Bildung des metachromatischen Komplexes an der Membran sind irreversible Verhältnisse aufgetreten, die die normalen Vorgänge der Permeabilität stören. Das wird auch dadurch klar, daß der Protoplast plötzlich stark Farbstoff aufnimmt. Treten Hüllenbildungen auf, so ist das nur als eine Abwehrreaktion gegen die konzentrierte Farblösung aufzufassen. Setzt man die Protozoen zu diesem Zeitpunkt in ein normales Kulturmedium um, dann werden die Lebensäußerungen wieder normal, beläßt man sie in der Farblösung, tritt der Tod je nach der Konzentration früher oder später ein. Bei einer Vitalfärbung werden keine Tektinsubstanzen ausgeschieden, weil im umgebenden Medium fast normale Zustände herrschen. Ein metachromatischer Komplex kann auch gar nicht gebildet werden, weil eine gewisse Konzentration des Farbstoffes, die unbedingt zur Bildung eines solchen notwendig ist, nicht vorhanden ist. Auch im Innern der Zelle wird nie eine metachromatische Färbung gefunden aus Gründen, die später in der Diskussion über den mut-

maßlichen Bau dieses metachromatischen Komplexes noch näher erörtert werden sollen.

Die gleichen Ergebnisse wie bei *Chlamydomonas Braunii* hatten wir auch bei *Trachelemonas hispida* (Stein) und *Trachelemonas volvocina* (Ehrenberg). Auch hier ist entweder die Innenwand des Gehäuses oder eine chromotrope Substanz, in die der Flagellatenprotoplast eingebettet ist, gefärbt. Im Dunkelfeld treten diese Substanzen nicht besonders hervor. Mit Kohlensäure wird kein Farbumschlag erhalten.

Es wurde schon oben erwähnt, daß der Komplex aus Agar und dem rotfluoreszierenden Brillantkresylviolett sich auch in ganz sauren Bereichen hält (bis pH 1), genau so wie der Komplex Agar-Thionin und Agar-Viktoria-blau 4 R. Die mit diesen Farbstoffen behandelten chromotropen Substanzen der Flagellaten waren ebenso gegen 1 n HCL beständig. Der metachromatische Farbton zeigte keinerlei Veränderungen. Die Komplexe anderer Farbstoffe dagegen werden zerstört. So wird Kresylechtviolett durch Salzsäure sofort entfärbt; der Komplex Agar-Toluidinblau hält zunächst den metachromatischen Farbton auch in stark sauren Bereichen (pH 2), um bei weiterer Zugabe von Säure plötzlich umzuschlagen.

An den zur Untersuchung gelangten Peridineen *Ceratium hirsutinella* (O. F. Müller) und *Peridinium tabulatum* (Ehrenberg) konnten mit basischen Farbstoffen keine chromotropen Substanzen nachgewiesen werden, ebenso an den Dauercysten, die als lichtbrechende, glasklare, weite Hüllen den Flagellaten in seiner normalen Form umgeben. Hier gilt das auch auf S. 51 über Dauercysten Gesagte. Anders aber verhält sich schon innerhalb der *Perideneae* die oben S. 53 erwähnte Gattung *Gymnodinium* (Familie *Kyrtodiniaceae*). Die festen Hüllen, mit denen diese Flagellaten sich in der kalten Jahreszeit umgeben, verhalten sich färberisch wie Dauercysten, doch die schleimigen, im Frühjahr bis Herbst gebildeten Hüllen reagieren mit geringsten Konzentrationen metachromatisch. Mit Toluidinblau 1 : 10.000 erhält man das Bild, wie es unsere Abb. 5 darstellt. Schon nach kurzer Zeit beginnen sich die Hüllen vom Rande her einzudellen und nehmen immer mehr Farbstoff auf, bis sie zu einem völlig dunklen Klümpchen zusammenschrumpfen.

Ein ähnliches Bild ergeben die metachromatischen Färbungen an den Hüllen von *Euglena sanguinea* (Ehrenberg) und *velata* (Klebs). Auch hier genügen sehr schwache Konzentrationen 1 : 50.000, um die Hüllen anzufärben. Sie nehmen immer mehr Farbstoff auf, schrumpfen und werden dunkel. Darum konnte die Färbung mit Kohlensäure nicht überprüft werden. Das Verhalten dieser Hüllen ist wohl auf ihre stark solartige Konsistenz zurückzuführen. Bei *Euglena deses* (Ehrenberg) und *caudata* (Hübner) sind dagegen starke Farbstoffkonzentrationen nötig 1 : 5000, um sie zur Schleimabsonderung zu veranlassen.

Von den anderen untersuchten Euglenen, deren Bestimmung überhaupt sehr große Schwierigkeiten bereitete, auf die wir aber hier nicht näher eingehen können, ist besonders eine Form interessant, die nach der Süßwasserflora von Pascher wohl für *Euglena proxima* (Dangeard) gehalten werden kann, aber in ihrem Habitus nicht ganz übereinstimmt. Mit Toluidin-

blau wird diese *Euglena* vollkommen rot gefärbt. Das ist jedoch nur scheinbar der Fall, denn nach ganz kurzer Zeit beginnt sich eine Membran wellenförmig abzuheben. Dieser Vorgang kann durch leichten Druck auf das Deckglas beschleunigt werden. Die metachromatisch gefärbte Membran liegt dann neben dem in seiner Form meist erhaltenen und jetzt ungefärbten Flagellaten. Sie zeigt bei stärkeren Konzentrationen eine streifige Struktur, bei schwächeren (1 : 30.000) ist sie homogen und quillt stark auf. Der metachromatische Farbton wie die gesamte Hülle bleibt auch nach dem Austrocknen des Präparates unverändert lange Zeit erhalten, ein Zeichen, daß hier der metachromatische Komplex völlig dehydratisiert ist. Besonders schöne Präparate werden mit den Farbstoffen Äthylviolett H und Nilblau B erhalten. Im Dunkelfeld ist das Bild der neutralrotgefärbten Membran nicht immer eindeutig, doch wird mit Janusgrün in jedem Falle das rote Streulicht erhalten. Wir haben also hier an dieser *Euglena*, wie Spek und Gillissen es an zahlreichen Amöben zeigen konnten, ebenfalls eine Zellmembran gefunden, die aus einer chromotropen Substanz besteht. An allen anderen *Euglena*-Arten, *Euglena acus* (Ehrenberg), *acutissima* (Lemmermann), *oxyuris* (Lemmermann), *viridis* (Ehrenberg) und an *Phacus hispidula* (Eichwein) und *longicauda* (Ehrenberg), wurden keine metachromatischen Färbungen an den vegetativen Zellen festgestellt. Besonders auffällig ist dieses Verhalten für *Euglena viridis*, deren Hüllenbildungen in der Literatur mehrfach beschrieben worden sind (z. B. Klebs : Organisation einiger Flagellaten-Gruppen).

Durch Absonderung chromotroper Substanzen zeichnet sich auch die zur Ordnung *Chrysomonadinae* gehörige *Synura uvella* (Ehrenberg) aus. Nach der Einwirkung von konzentrierten Janusgrünlösungen (1 : 5000 bis 1 : 10.000) werden am Rande der Kolonie schubweise Substanzen abgegeben, die mit dem Farbstoff sofort einen festen Komplex bilden, so daß keine einheitliche homogene Hülle entsteht, sondern nacheinander gebildete, der äußeren Form der Kolonie sich anpassende Lagen. Mit anderen basischen Farbstoffen erhält man entweder das gleiche oder ein ähnliches Bild. In der Folge quillt die Kolonie ganz auseinander. Der Rand, und auch oft einzelne Substanzen im Einzelindividuum, sind im orthochromatischen Farbton tingiert; im ganzen ist die Färbung scheinbar eine metachromatische. Im Verlauf einer halben Stunde nämlich wird der Kern, dessen Lage auch durch die Feulgen-Reaktion bestimmt wurde, immer stärker rot gefärbt, während die metachromatische Färbung des Einzelflagellaten mehr und mehr verblaßt. Es handelt sich also hier sicher nicht um eine Fällungsmetachromasie. Die metachromatische Kernfärbung wurde auch an Colpidien gefunden (s. S. 46), ebenso an der cryptomonadinen *Chilomonas paramaecium* (Ehrenberg). Diese Kernfärbungen, die mit besonderer Regelmäßigkeit bei *Synura* zu finden waren, sind offensichtlich von anderer Natur als die metachromatischen Komplexe der Fällungsmetachromasie. Mit verdünnter Salzsäure wurden orthochromatische Umschläge beobachtet, obwohl durch die Behandlung mit Salzsäure oder Kohlensäure die Chromatophoren, zwischen denen der Kern liegt, stark Farbstoff aufnehmen und sich rasch dunkel färben und den Kern zum Teil überdecken, so daß

auch wegen der Kleinheit des Objekts die Beobachtung sehr schwierig ist. Auch sonst zeichnen sich diese metachromatischen Kernfärbungen dadurch aus, daß sie verhältnismäßig schnell eindunkeln, d. h. den Farbstoff im orthochromatischen Farbton nach und nach absorbieren, und unterscheiden sich dadurch schon von den gewöhnlichen metachromatischen Komplexen. Im Dunkelfeld leuchten die letzteren mit Janusgrün feuerrot, während die Region des Kerns blau erscheint.

### 7. Färbungen mit anderen Schleimfarbstoffen

Diese metachromatischen Färbungen an Protozoen sollten nun noch mit den bekannten Schleimfarbstoffen aus der Histologie überprüft werden. Nach Schaffer kann man nach dem färberischen Verhalten zwischen mukösen und mukoiden Schleimen unterscheiden. Mit den basischen Farbstoffen Safranin, Thionin und Toluidinblau sowie mit Muzikarmin werden die mukösen, mit Bestschem Karmin und Anilinblau die mukoiden Schleime gefärbt. Nach den in dieser Arbeit ausgeführten Färbungen mit den metachromatischen Farbstoffen Safranin, Thionin und Toluidinblau war schon zu erwarten, daß diese Schleimsubstanzen in die muköse Gruppe eingereiht werden können. In der Tat fielen alle Färbungen der chromotropen Substanzen mit Muzikarmin positiv aus. Die Membran der *Euglena proxima* war typisch rot gefärbt und löst sich genau so vom Flagellaten wie bei der Behandlung mit basischen Farbstoffen, allerdings ohne daß Strukturen erkennbar wurden, wie man sie mit stärkeren Konzentrationen bei metachromatischen Färbungen erhält.

*Volvox aureus* wurde in einem Gemisch von einem Teil Formol und zwei Teilen abs. Alkohol fixiert, ebenso in Bouin. Mit Bestschem Karmin wird das äußere Gallertlager nicht oder nur ganz schwach gefärbt, dagegen treten die Tochterkugeln (nicht ihre Schleimhüllen) und eine im Innern liegende Substanz stark gefärbt hervor. Hier handelt es sich wahrscheinlich um die wenig konsistente Gallerte, die, wie wir oben berichtet haben, im Dunkelfeld durch leichten Druck auf das Deckglas aus der Mitte der Kolonie mit Janusgrün rotleuchtend austritt. Mit Anilinblau wird die Kolonie vom Rande aus ganz schwach bläulich gefärbt. Mit der Bestschen Färbung ist keine Übereinstimmung vorhanden. Mit Muzikarmin dagegen erhält man ein Bild, wie es die metachromatischen Farbstoffe auch geben.

### 8. Diskussion

Wie in der Einleitung schon gesagt wurde, sollte in dieser Arbeit das Verhalten der chromotropen Substanzen an möglichst zahlreichen tierischen Objekten bei direkter Farbstoffeinwirkung untersucht werden. Das war notwendig, weil der größte Teil der Arbeiten, die das Metachromasieproblem behandeln, entweder an fixierten Schnitten oder an Modellsubstanzen ausgeführt wurde. Diesen Arbeitsmethoden, die das dynamische Geschehen der Zelle nicht in Betracht ziehen, müssen Untersuchungen am lebenden Objekt parallel laufen, wenn die aus den anderen Arbeiten gezogenen Schlüsse nicht nur einen begrenzten Wert haben sollen.



Schon Spek konnte in zahlreichen Versuchen zeigen, daß mit Vitalkonzentrationen keine metachromatischen Reaktionen erzielt werden können. Er färbte Gewebe, z. B. Knorpellamellen vom Hinterende des Sternums von *Rana esculenta* sowie Randsäume vom Coracoid von *Salamandra maculosa*, die schon von vornherein große Mengen von chromotropen Substanzen enthalten, vital mit basischen Farbstoffen an; zum anderen machte Spek mit Hilfe von Mikromanipulator und Mikropipetten Injektionen von Lösungen chromotroper Substanzen in Zellen, welche mit metachromatischen Farbstoffen vital gefärbt wurden. Das Ergebnis war so, daß in keinem Falle eine metachromatische Reaktion mit den verdünnten Farbstofflösungen zustande kam. Wohl färbten sich Substanzen im Farbton der alkalischen Seite, doch durch Einleiten von Kohlensäure oder Einlegen dieser Objekte in Natriumacetat-Essigsäurepuffer pH 4,62 konnten diese Umschläge rückgängig gemacht werden.

Lison (1935) untersuchte das Verhalten von Modellsubstanzen wie Agar und Chondroitinschwefelsäure mit basischen Farbstoffen im Reagenzglas. Er fand, daß schon geringe Mengen dieser Substanzen auch in sehr verdünnten Lösungen nachgewiesen werden können. Die basischen Farbstoffe zeigen dann einen Farbton, der sonst nur in alkalischen Bereichen auftritt. Diese Erscheinung wurde als „L'erreur metachromatique“ bezeichnet und fand in der Folgezeit überall Beachtung in der Literatur. Damit schienen alle kolorimetrischen pH-Messungen mit den bekannten basischen Farbstoffen hinfällig zu sein, denn schon geringste Mengen von chromotropen Substanzen in der Zelle sollen eine Alkalität vortäuschen, die in Wirklichkeit gar nicht vorhanden ist. Diese nur auf Modellversuchen basierende Anschauung muß als etwas voreilig gelten, denn in der lebenden Zelle verhalten sich chromotrope Stoffe den Farblösungen gegenüber ganz anders. In der lebenden Zelle selbst sind sie anscheinend weder mit Vitalkonzentrationen noch mit stärkeren Farblösungen festzustellen. Das wird auch aus Speks Versuchen an der Amöbenmembran deutlich. Durch Anpusten mit der Mikropipette war diese nur von außen, nicht vom Innern her mit starken Konzentrationen färbbar. Es sind also im Innern der Zelle besondere Faktoren vorhanden, die diese Reaktion der beiden Komponenten Farbstoff + chromotroper Substanz verhindern. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten entgegen den Anschauungen Lisons in der Zelle selbst keine metachromatischen Anfärbungen festgestellt werden. Einmal werden diese Komplexbildungen nur mit sehr starken Farblösungen erhalten, keineswegs bei der Vitalfärbung; zum anderen traten sie nur außerhalb der Zelle und nach ihrer Quellung hervor. Die an Protozoen beobachteten metachromatischen Färbungen treten erst bei 1 : 50.000 und stärkeren Konzentrationen auf, und es läßt sich daraus die allgemeine Regel ableiten, daß die Fällungsmetachromasie da beginnt, wo die Vitalfärbung aufhört.

Die mit Janusgrün und Neutralrot gefärbten chromotropen Substanzen verhalten sich im Dunkelfeld recht unterschiedlich. Einige Objekte, wie z. B. die Trichocyten von *Paramaecien*, die ausfließenden chromotropen Stoffe bei *Pandorina* u. a. zeigen mit Neutralrot das grüne, mit Janusgrün

das rote Tyndall-Licht, andere wiederum, und das sind die recht festen gelartigen Hüllsubstanzen, zeigen Übergänge im Farbton, oder der Komplex erscheint optisch leer. Das Streulicht beruht auf der Beugung des Lichtes an den metachromatischen Komplexen einer bestimmten Größenordnung. Ferner ist für den positiven Ausfall dieser Reaktion eine gewisse Beweglichkeit dieser Komplexe im Sol oder Gel nötig, und ebenso spielt auch der Grad der Hydratation eine wichtige Rolle. Das Streulicht fällt jedenfalls immer an Hüllen und Gallertsubstanzen von solartigem Charakter positiv aus und an Substanzen, die von gelartiger Natur sind, negativ. Ist das Gel noch fester in seiner Konsistenz, dann kommt es nicht einmal mehr zu einer Anfärbung desselben, wie die Versuche an den Dauercysten zeigen. Wir stellen uns den Vorgang der Entstehung dieses Streulichtes etwa folgendermaßen vor: Der Farbstoff verbindet sich mit der chromotropen Substanz in der Weise, daß aus diesem Komplex Wasser austritt. Die metachromatisch gefärbten Substanzen sind ja stark oder teilweise sogar völlig dehydratisiert und erhalten dadurch die Eigenschaften eines Suspensionskolloids, das sich deutlich im Dunkelfeld von einem hydrophilen Kolloid durch seine stark leuchtenden Teilchen unterscheidet. Dieser Effekt beruht darauf, daß bei letzterem Wasser an- oder eingelagert enthalten und infolgedessen der Brechungsexponent von disperser Phase und Dispersionsmittel sehr gering ist. Diese Erscheinung ist also auch als ein weiterer Beweis für eine Dehydratisierung der Komplexe zu werten. Bei den gelartigen chromotropen Stoffen ist die Beweglichkeit der Teilchen eingeschränkt, und der Komplex ist von größerer Struktur. Das Streulicht zeigt Übergänge im Farbton, weil eine gewisse Größenanordnung des Komplexes nicht vorhanden ist, so wie man von feindispersen Gold, das im Ultramikroskop rot leuchtet, alle Übergänge bei größeren Phasen von Violett nach Blau erhält. Als spezifische Reaktion ist dieses Streulicht also nicht zu werten, doch können damit chromotrope Sole im Dunkelfeld analysiert werden.

Was den Bau des Komplexes selber anbetrifft, so ist die Erklärung von Bank und Bungenberg de Jong sehr bestechend. Sie fassen die Metachromasie „als Folge der Elektroadsorption des Farbstoffkations an die ionogenen Stellen des negativen Biokolloids“ auf. In erster Linie ist die Ladungsdichte eines Biokolloids, in zweiter Linie die Zusammensetzung ihrer ionogenen Gruppe wichtig. So sind die sulfatführenden Kolloide Mucoidinschwefelsäure und Chondroitinschwefelsäure besonders gute Metachromasieerreger, weil sie einmal die günstigen Sulfatgruppen führen und zum anderen sehr ladungsdicht sind. Der metachromatische Farbton selbst ist die Folge einer Aggregation der Farbstoffionen, die durch van der Waalsche Kräfte zustande kommt. Die Farbstoffionen haften nicht mit ihren ionisierten Stellen aneinander, sondern „kleben mit ihren organischen Resten fest“. An diesen Stellen sollen die Alkohole angreifen, die bekanntlich die Metachromasie stören und die Aggregation der Farbstoffionen lockern. Gegen diese Theorie ist folgendes anzuführen: Aus der Vitalfärbung ist bekannt, daß Adsorptionsverbindungen nur langsam entstehen, und erst recht kann man sich dieses Verhalten von der nachfolgenden

Aggregation der Farbstoffionen mit Hilfe der van der Waalschen Kräfte vorstellen. Die Erscheinungen der Fällungsmetachromasie treten aber plötzlich im Moment des Zusammentretens beider Komponenten auf. Weiterhin ist schwer einzusehen, auf welchen Faktoren die große pH-Beständigkeit bei diesen verhältnismäßig lockeren Elektroadsorptionsverbindungen beruhen. Es konnte ja nachgewiesen werden, daß die Komplexe mit verschiedenen Farbstoffen im Bereich von pH 1 bis 12 unverändert existieren. Wenn das nicht mit allen metachromatischen Farbstoffen der Fall ist, so liegt das daran, daß wie bei Kresylechtviolett der Farbstoff durch Säurezusatz einfach zerstört wird. Durch eine Aggregation von Farbstoffionen kann auch ein Farbtonwechsel nicht erklärt werden. Die Farbionen sind ja immer für den orthochromatischen Farbton verantwortlich. Kommt es wirklich zu einer Aggregation, dann fragt es sich, ob sie noch als Ionen vorliegen. Den reinen metachromatischen Farbton tragen die undissoziierten Farbsalzmoleküle, wie S p e k photometrisch feststellen konnte. In einem wäßrigen Medium ist aber bei der Annahme einer Adsorptionsbindung das Vorhandensein von Farbsalzmolekülen ziemlich unwahrscheinlich.

Auch bei den optischen Untersuchungsmethoden stützt man sich zum Teil auf falsche Voraussetzungen. Die Metachromasie der Ribonucleinsäuren und auch von Agar wird von anderen Autoren (Flax u. Himes 1952) auf eine Polymerisation des Farbstoffs zurückgeführt. Zu diesem Schluß kommt man durch die Ähnlichkeit der Absorptionsspitzen der Farbstoffe, welche an Gewebe gebunden sind, mit denen, die in der Farblösung vorhanden sind. Die metachromatischen Farbstoffe in wäßrigen Lösungen folgen nicht dem Beerschen Gesetz, und viele Autoren beziehen sich darum auf die Arbeiten von S c h e i b e (Kolloidzeitschrift 82, 1938), der bei seinen Untersuchungen verschiedener Farbstoffe, z. B. Pinacyanol, die erste in verdünnten Lösungen auftretende Bande der monomolekularen Form zuschreibt und die zweite dem Polymerisat. Für die basischen metachromatischen Farbstoffe ist das nicht richtig. Fast alle Autoren haben übersehen, daß diese Farbstoffe fluoreszieren, S p e k dagegen konnte schon 1940 nachweisen, daß die erste in sehr verdünnten Lösungen auftretende Bande die des fluoreszenzerregenden Lichtes ist, die natürlich bei der Konzentrationszunahme in gleichem Sinne mit der des Farbsalzes nicht zunehmen kann, da die Fluoreszenz in konzentrierteren Lösungen ja durch die sogenannte Konzentrationslöschung schwächer wird. Es kann also aus dem Verhalten dieser beiden Banden nicht auf ein Anwachsen der Polymerisation geschlossen werden, ebensowenig wie auf zwei Farbstoffmodifikationen, deren Proportion nach Lison 1935 sich in der Farblösung bei zunehmender Konzentration verschieben soll.

Für die Vorstellung, die wir von diesem Komplex haben, ist das auch gar nicht nötig. Nach S p e k ist die Reaktion zwischen chromotropen Substanzen und den sogenannten metachromatischen Farbstoffen eine spezifische, bei der sich die beiden Komponenten gegenseitig ausfällen. Die ausgefällte Substanz macht einen eigenartigen, sehr dehydrierten Eindruck und besteht aus dünnen Häutchen und Fetzen und zerfällt beim Schütteln in ein trockenes Pulver. Der Farbstoff ist in ihm fest in sehr wasserarme

oder gar wasserfreie Kolloidteilchen eingebaut und kann dort nur in Form der Farbsalzmoleküle vorliegen. Die Moleküle der Farbsalze haben aber, wie Aussalzversuche und Farbänderungen sehr konzentrierter Farblösungen lehren, eine andere Farbe als ihre Ionen, und damit ist auch die Erklärung für die Komplexbildung zwischen chromotroper Substanz und metachromatischem Farbstoff gegeben. Die Moleküle des Farbsalzes oder der Farbbase haben die gleiche oder doch eine sehr ähnliche Farbe. Hieraus erklärt sich das alte Rätsel, daß der metachromatische Farbton annähernd dem der freien Base entspricht und in dem metachromatisch gefärbten Komplex doch nicht die Farbbase vorliegt. Durch starke Ansäuerung kann der Komplex gesprengt werden, wobei der metachromatische Farbton verschwindet. Innerhalb weiter Grenzen bleibt aber der metachromatische Farbton von einer Änderung des pHs der Umgebung unberührt. Auch das ist jetzt ohne weiteres verständlich, denn in welcher Form der Farbstoff im Komplex mit der chromotropen Substanz auch vorliegt, mit den H-Ionen der Umgebung kann er nicht in Wechselwirkung treten, da ja in dem dehydrierten Teilchen zu so einer Reaktion gar kein Wasser zur Verfügung steht. Die Farbsalzmoleküle des metachromatisch gefärbten Komplexes gehen wieder in orthochromatisch gefärbte Ionen über, wenn der Komplex gesprengt wird und Wasser in ihn eintritt.

Komplexe ähnlicher Art sind aus der Chemie schon seit einiger Zeit bekannt. Es handelt sich um die sogenannten Einschlußverbindungen. Der einschließende Stoff muß Hohlräume haben, die entweder schon in der Molekel vorhanden sein können oder sich im Kristallgitter des einschließenden Stoffes befinden; ferner muß der einzuschließende Stoff in den vorhandenen Hohlräumen genügend Platz finden. Als Einschlußverbindung hat sich z. B. die Jod-Stärke-Reaktion herausgestellt (Einzelheiten in der Zeitschrift *Angewandte Chemie* Nr. 16, 1952: F. Cramer, Einschlußverbindungen). Die intensive Blau- oder Violettfärbung des Jods wurde bisher als eine Adsorption der Jodmoleküle an die Stärke gedeutet. Auch Agar gibt eine blaue Jodfarbe, was nur Einschlußverbindungen tun, soweit man heute weiß. Agar bildet also mit Sicherheit Einschlußkanäle. Besonders auffällig ist auch hier, daß die Färbung beim Erhitzen reversibel verschwindet, eine Eigenschaft, die auch unsere metachromatischen Komplexe aufweisen. Eine Übereinstimmung zeigt auch das Verhalten der Indikatoren in solchen Einschlußkanälen, z. B. in Cyklodextrinen, den Abbauprodukten der Stärke. Sie schlagen in ganz anderen pH-Bereichen um. Methylorange bleibt auch in saurer  $\beta$ -Dextrinlösung gelb. Kongorot bildet mit  $\gamma$ -Dextrin eine Einschlußverbindung und ist dann in saurer Lösung nicht mehr blau. Hier soll auch an die Befunde von Burkl (1951) erinnert werden, der nach Behandlung mit Chromsäure ebenfalls die dabei entstehenden Abbauprodukte der Stärke metachromatisch färben konnte. Die Farbstoffe verhalten sich so, als ob sie in einer alkalischen Lösung wären, doch wird der pH-Wert nicht geändert. Cramer (1952) nimmt an, daß eine solche Lösung aus zwei Phasen besteht, einer sauren wäßrigen und einer zweiten mikroheterogenen im Dextrinhohlraum. Auch für Eiweißsubstanzen sind Einschlußverbindungen nachgewiesen worden. So können z. B. Globine und

Albumine Farbstoffe und auch Salze in dieser Weise binden. Das Zurückdrängen der Metachromasie durch Salze läßt sich also so deuten, daß auch Salze in die Hohlräume eingeschlossen werden, die demnach den Farbstoff verdrängen. Die Bildung von Farbstoff-Protein-Verbindungen wird dadurch erkannt, daß in Proteinlösungen Verschiebungen der Absorptionsmaxima auftreten. Das sind ebenfalls Erscheinungen, die aus der spektroskopischen Untersuchung der Metachromasie bekannt sind. Auch die Tatsache, daß in der Zelle niemals chromotrope Substanzen nachgewiesen werden, läßt sich an Hand der Einschlufverbindungen deuten. Die Hohlräume sind entweder von Salzen oder anderen Stoffen blockiert oder erlangen erst ihre erforderliche Größe für die Farbstoffeinlagerung durch die Quellung nach dem Austritt in das umgebende Medium. Auch die rätselhaften Färberscheinungen der negativen und positiven Metachromasie von Nucleinsäuren lassen sich auf diese Weise leichter erklären. Lison und Mutsaers (1950) konnten z. B. feststellen, daß das Maximum der positiven Metachromasie erhalten wird, wenn 500 Moleküle Thionin auf ein Phosphorsäureradikal bezogen werden, während bei negativer Metachromasie nur 50 Moleküle des Thionins für ein Phosphorsäureradikal vorhanden sind. Ein ähnliches Verhalten zeigt auch die Hyaluronsäure. Diese Erscheinung hängt vielleicht von der Größe des Molekülkäfigs ab, der in einem bestimmten Zustande 500, in einem anderen eben nur 50 Moleküle Thionin aufnehmen kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine metachromatische Färbung an Protozoenkernen nachgewiesen werden. Für den Nachweis der chromotropen Substanzen tritt damit eine Schwierigkeit auf, denn es handelt sich in diesem Falle nicht um ein Tektin, sondern um Nucleinsäuren, die diese Reaktion auslösen. Zur Unterscheidung kann bisher nur die bedeutend langsamere Art der Anfärbung und die nicht in so weiten Grenzen wie bei den Tektinsubstanzen liegende pH-Beständigkeit herangezogen werden. Die metachromatische Anfärbung der Kerne kommt auch nicht mit jener Regelmäßigkeit zustande wie an den Tektinkomplexen. Dieses Verhalten der Kerne bei der Einwirkung konzentrierter basischer Farbstofflösungen wird ein Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Überblickt man das Verhalten der Einschlufverbindungen und der metachromatischen Komplexe, so finden sich folgende Übereinstimmungen:

1. Einschlufverbindungen und metachromatische Komplexe kommen immer leicht bei starken Farbstoffangeboten zustande;
2. Einschlufverbindungen und metachromatische Komplexe haben den sogenannten Temperatureffekt gemeinsam;
3. gleichen sie sich im Verhalten der Indikatorreaktion;
4. beiden Bindungstypen ist eine gewisse Säurefestigkeit eigen;
5. ist eine Ähnlichkeit in den photometrischen Kurven vorhanden;
6. ist das Vorhandensein von Hohlräumen in Mucopolysacchariden, z. B. in Agar, nachgewiesen;
7. stimmen sie im Verhalten gegen Salze überein.

Die Natur dieser Einschlufverbindungen ist zwar noch nicht hinreichend geklärt, und es läßt sich heute noch nicht schlüssig beweisen, ob es sich in



unserem Falle wirklich um eine Einschlußverbindung handelt, da die genaue räumliche Struktur der genannten Polymeren bisher noch in keinem Falle bekannt ist. Doch wurde auch von anderer Seite schon eine Einschlußverbindung für Agar und Schleims-substanzen in Erwägung gezogen (F. Cramer 1954). Das in vielen Fällen übereinstimmende Verhalten der Einschlußverbindungen und der Farbstofftektinkomplexe läßt aber doch vermuten, daß die letzteren aus einer Verbindung dieser Art bestehen.

Großen Dank schulde ich meinem hochverehrten Lehrer Herrn Prof. Dr. J. S p e k dafür, daß er mir jederzeit seine wertvollen wissenschaftlichen Erfahrungen zur Verfügung stellte.

### 9. Kurze Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Es wurde das Verhalten der chromotropen Substanzen an lebenden Objekten (Protozoen) bei direkter Farbstoffeinwirkung untersucht. Aus den gesetzmäßigen Anfärbungen des Tektins, der Trichocysten und der verschiedensten Gallertsubstanzen der Flagellaten ergibt sich für diese Stoffe eine Chromotropie, die auf der Bildung eines metachromatischen Komplexes beruht. Dieser zeichnet sich durch die folgenden Kriterien aus:

1. Die Bildung solcher Komplexe gelingt nie in, sondern nur außerhalb der Zelle, mit einer Ausnahme, der unter manchen Umständen sich metachromatisch anfärbenden Zellkerne.
2. Die Anfärbungen kommen nur mit Farbstoffkonzentrationen zustande, die höher sind als die zur Vitalfärbung verwandten. Daraus läßt sich die Regel ableiten, daß die Fällungsmetachromasie da beginnt, wo die Vitalfärbung aufhört.
3. Die metachromatischen Anfärbungen sind in weiten Grenzen pH-beständig.
4. Im Dunkelfeld zeichnen sich solartige mit Janusgrün und Neutralrot gefärbte Substanzen durch ein rotes bzw. grünes Streulicht aus, während in gelartigen Komplexen das Streulicht Übergänge im Farbton zeigt. Das starke Leuchten im Ultramikroskop beruht auf der Dehydratation des Komplexes. In diesen ist das undissoziierte Farbsalzmolekül als Träger des metachromatischen Farbtons eingebaut.
5. Es wurde der Versuch gemacht, den Komplex als Einschlußverbindung zu erklären.

### Literatur

- Bank, O., und H. G. Bungenberg de Jong, 1939: Untersuchungen über Metachromasie. *Protoplasma* 32.
- Bignardi, C., 1939: Cellule mucose e cellule mucoidi. *Arch. ital. Embryol.* 42.
- Bresslau, E., 1921: Die experimentelle Erzeugung von Hüllen bei Infusorien als Parallele zur Membranbildung bei der künstlichen Parthenogenese. *Naturw.* 9.
- 1921: Neue Versuche und Beobachtungen über die Hüllenbildung und Hüllsubstanz der Infusorien. *Verh. dtsh. Zool. Ges.* 26.
- 1922/23: Hüllenbildung und Gehäusebau bei Protozoen. *Mikrokosmos* 16.
- 1922: Ausscheidung entgiftender Schutzstoffe bei Ciliaten. *Zbl. Bakter. usw.*, I. Abtlg. 89.



- Bresslau, E., 1924: Neues über das Tektin. Verh. dtsch. Zool. Ges. 29.
- 1924: Die Ausscheidung von Schutzstoffen bei einzelligen Lebewesen. Ber. Senckenberger Naturf. Ges. 54.
- Die Stäbchenstruktur der Tektinhülle. Heft 24 d. Arbeiten an dem staatl. Inst. f. experim. Therapie in Frankfurt.
- 1922: Zur Systematik der Ciliatengattung *Colpidium*. Zoolog. Anz. 55.
- Burkl, W., 1951: Über den metachromatischen Färbefekt der mukoiden Drüsen nach Einwirken von Chromsäure auf den histologischen Schnitt. Anat. Anz. 98.
- Cavaliere, L. F., and A. Angelos, 1950: Studies on the structure of nucleic acids I. J. amer. chem. Soc. 72.
- S. E. Kerr, and A. Angelos, 1951: Studies on the structure of nucleic acids II. J. amer. chem. Soc. 73.
- Cramer, F., 1952: Einschlufverbindungen. Angew. Chemie 64.
- und W. Herbst, 1952: Die Lichtabsorption von Jodkettenmolekeln. Naturw. 39.
- 1954: Einschlufverbindungen. Springer-Verlag, Berlin.
- Czaja, A. Th., 1950: Untersuchungen über metachromatische Färbungen von Pflanzengewebe. Planta 11.
- 1936: Untersuchungen über den Membraneffekt des Adsorptionsgewebes und über die Farbstoffaufnahme in die lebende Zelle. Planta 26.
- 1934: Untersuchungen über metachromatische Färbungen von Pflanzengewebe. Planta 21.
- Ehrlich, P., 1877: Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocyten. Arch. mikrosk. Anat. (Berl.) 13.
- Flax, M. H., and M. H. Himes, 1952: Microspectrophotometric analysis of metachromatic staining of nucleic acids. Physiologic. Zool. 25.
- Hansen, F. C. C., 1908: Über die Ursachen der metachromatischen Färbung bei gewissen basischen Farbstoffen. Z. Mikrosk. 25.
- Holmgren, H., 1940: Studien über Verbreitung und Bedeutung der chromotropen Substanzen. Z. mikrosk.-anat. Forsch. 47.
- Kahl, A., 1930: Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeressteile. Verlag G. Fischer, Jena.
- Kelly, J. W., 1950: The localisation of a metachromatic substance in the *Chaopterus* egg. Protoplasma 39.
- Landsmeer, J. M. F., 1951: Some colloid chemical aspects of metachromasia... Acta physiol. et pharmacol. Neerl. 2.
- Lison, L., 1955: Sur la détermination du pH intracellulaire par les colorants vitaux indicateurs. L'erreur metachromatique. Protoplasma 24.
- et Fautrez, 1953: L'étude physicochimique des colorants dans ses applications biologiques. Étude critique. Protoplasma 33.
- 1955: Études sur la metachromasie. Arch. Biol. (Fr.) 46.
- and W. Mutsaers, 1950: Metachromasy of nucleic acids. Quart. J. Micr. Sci. 91.
- Michaelis, L., 1925: Metachromasie. Enzykl. d. mikroskop. Technik.
- and S. Granick, 1945: Metachr. of basic dyestuffs. J. amer. chem. Soc. 67.
- 1947: The nature of the interaction of nucleic acid and nuclei with basic dyestuffs. Symp. Quart. Biol. 12.
- Möllendorf, W. v., 1924: Untersuchungen zur Theorie der Färbung fixierter Präparate. Erg. Anat. 25.
- Oehler, R., 1920: Gereinigte Ciliatenzucht. Arch. Protistenk. 41.
- 1924: Weitere Mitteilungen über gereinigte Ciliaten- und Amöbenzucht. Arch. Protistenk. 49.
- Pascher, A., 1914-1927: Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. Verlag Fischer, Jena.

- Prowazek, S. v., 1916: Zur Morphologie und Biologie von *Colpidium*. Arch. Protistenk. 36.
- Scheibe, G., 1958: Reversible Polymerisation als Ursache neuartiger Absorptionsbanden von Farbstoffen. Kolloid-Z. 87.
- Seshachar, B., 1953: Metachromasy of the ciliate macronucleus. J. exper. Zoology. Oktober.
- Spek, J., 1944: Optische Analysen von Vitalfärbungen. Jena. Z. Naturw. 77.
- 1940: Metachromasie und Vitalfärbung mit pH-Indikatoren. Protoplasma 34.
- und Chambers, 1933: Neue experimentelle Studien über das Problem der Reaktion des Protoplasmas. Protoplasma 20.
- und Gillissen, 1943: Die Zellmembran der Amöben — eine chromotrope Substanz. Protoplasma 37.
- Syven, B., 1950: The qualitative distribution of metachromatic polysaccharide material during hair growth. Karolinska Inst. Stockh. Exper. Cell Res. 1.
- Wiame, J. M., 1947: Études d'une substance polyphosphoree, basophile et metachromatique chez les levures. Biochem. biophys. acta 1.
- Wislocki, G. B., H. Bunting, and F. F. Dempsey, 1947: Metachromasia in mammalian tissues and its relationship to mucopolysaccharides. Amer. J. Anat. 81.

# A Study of the Dynamics of $K^{42}$ uptake by Sunflower Plants with the Aid of a Scintillation Count-Rate Meter<sup>1</sup>

By

Herbert Jonas<sup>2</sup>

With 5 Figures

(Received August 19, 1955)

## Introduction

Translocation and accumulation of alkaline salts can be studied from the point of view of their osmotic effects on growth and cell development. Osmotic pressures of nutrients of  $> 19$  atm have been shown to be lethal. Tensions of  $< 3$  atm did not reduce the growth of crop plants, and those of  $< 1.5$  atm maximized it [1, 6]. Radioactive potassium in the nutrient medium provides an excellent means to relate the uptake of a cation to its osmotic pressure.

The purpose of the present investigation is a time-sequential study of patterns of potassium uptake which presents several questions: What law, if any, does the process of potassium uptake follow, when sunflower plants are subjected to sudden changes of the external potassium concentration? To which extent can sunflower roots regulate the entry of potassium ions? Is tolerance of nonhalophytic plants to alkalinity and to potassium determined by time-dependent or concentration-dependent factors? With these questions in mind the following experiments were performed.

## Methods

Sunflower plants (*Helianthus annuus*) were grown from seed until the fourth pair of leaves was sufficiently large for the application of a scintillation counter to the central leaf vein. The plants were then transferred to single salt solutions of  $K^{42}HCO_3$ , out of which  $K^{42+}$  started to enter the

<sup>1</sup> This work was undertaken while the author was a Postdoctoral fellow of the National Research Council in conjunction with the U. S. Atomic Energy Commission.

<sup>2</sup> Present address: Cancer Research Laboratory, The Medical School, The University of Virginia, Charlottesville, Virginia, U. S. A.

xylem. The resultant radioactivity was measured by a localizing scintillation count-rate meter [4].

Sunflower seeds were planted into washed, commercial vermiculite in No. 2 earthenware crocks with bottom drains. The vermiculite was alternately subirrigated with and drained of 1/10 strength Hoagland's No. 2 nutrient solution [2] by the proper adjustment of a hydraulic irrigation system. The total macronutrient concentration was 18.71 me/l., equal to 0.77 atm osmotic pressure, disregarding the additional micronutrients B, Cu, Fe, Mn and Zn. The plants grew under a daily dose of 15 hours of artificial light of an intensity of 1,400 foot-candles about 84 cm. above the vermiculite level. Illumination ceased at 8 p. m. A fan moved air horizontally over the plants about 140 cm. above the vermiculite. This culture system produced vigorous plants.

When the leaves of the fourth pair were 12 to 15 cm. long, the plant was removed from the vermiculite, and the roots were rinsed with tap and distilled water. The plant was transferred to 2 liters of distilled water in a Tygon coated No. 10 tin can, which was then placed into the counter assembly. About a half hour elapsed between removal of the plant from the crock and full operation of the counter assembly. The time interval was used to add a selected mixture of  $\text{KHCO}_3$  and  $\text{K}^{42}\text{HCO}_3$  to the water which was aerated vigorously throughout the experiment. Then the lead shielding of the apparatus was completed [4], the time being then approximately 10 a.m.

Five concentrations of potassium bicarbonate with osmotic pressures of 0.284, 0.864 (approximately equal to the osmotic pressure of the previously used Hoagland's solution), 2.570, 7.560 and 28.15 atm were then prepared one after the other in the tin can. Osmotic pressures were calculated from the freezing point depression of the solution [3].

The range of 0.284 to 28.15 atm osmotic pressure was selected to enclose a hypotonic value and one above the 15 atm permanent wilting soil-water tension. Each plant remained in its respective potassium bicarbonate solution for 2 to 3 days, while the amount of decaying  $\text{K}^{42}$  in the area surrounding the central leaf vein of one leaf of the fourth pair was recorded.

## Results

### General observations

The time sequence of decay corrected total counts per minute (c/m) indicated a three phase uptake from the time of the addition of the isotope to 1,800 min. later. The first phase was a period of rapid exponential accumulation; saturation occurred during the next phase; and a sudden increase of potassium uptake was found in the third phase from all but the 0.864 atm solution. These phases appeared to be independent of the light periods.

The elapsed time at the end of the saturation phase showed a positive exponential relation with the osmotic pressure of the solution. Furthermore the pressure, at which the leaves first showed scorching, was related

inversely to the elapsed time, at which leaf damage was detected first. This period of time varied directly with the time at which the maximum  $K^{42}$  concentrations appeared in the leaves.

### Detailed study

The total apparent potassium activity was observed continuously on the recorder of the scintillation countrate meter. The record of the recording milliammeter was inspected visually for fluctuations and abnormalities. Experiments which showed abnormal background fluctuations and abnormalities were repeated. The record was read off the recording chart at 1 min. intervals until a fairly smooth and level tracing appeared at about  $\frac{1}{2}$  to  $1\frac{1}{2}$  h. after the addition of the isotope. Then 15-min. intervals were read off until 1 h. intervals became justified by a smooth tracing.

The net apparent activity was determined by the following method:

Let  $B$  = observed background current in milliamperes before the addition of the isotope,

$C$  = observed current after the addition of the isotope and after completion of its shielding,

$K$  = factor for decay correction where zero-time is the time of the isotope addition,

$n$  = number of background readings at 1-minute intervals,

$N$  = net current after background and scale factor correction,

$S$  = scale factor of the count-rate meter as determined by scale calibrations with a signal generator,

$t$  = time in minutes,

$T_{1/2}$  = half life of the isotope in minutes,

$y_0$  = apparent activity of isotope in counts per minute under the crystal in the tested leaf area,

$y = y_0$  corrected for decay.

Then the mean background current

$$\bar{B} = \frac{B}{n}, \quad (1)$$

and the net current is expressed as

$$N = (C - \bar{B}) \frac{S_x}{S_1}. \quad (2)$$

The decay-corrected apparent activity is a function of the relative magnitudes of net current and half life, because

$$y = y_0 e^{-\frac{0.693}{T_{1/2}} t}, \quad (3)$$

and

$$y = y_0 e^{-\frac{0.693 t}{746.40}}. \quad (4)$$

The correction factor for decay is therefore

$$K = \frac{y}{y_0} = e^{-0.000928 t}, \quad (5)$$

which is related to the corrected activity by

$$y = \frac{N}{K} S_x \quad (6)$$

It can be expanded by substituting corresponding values to

$$y = S_x (C - \bar{B}) \frac{S_x}{S_1} \left( \frac{1}{e^{-0.000928 t}} \right), \quad (7)$$

or in a simplified form

$$y = \frac{S_x^2}{S_1} (C - \bar{B}) e^{0.000928 t}. \quad (8)$$

Corrections for effects of variations of the temperatures of cooling water for the scintillator and of room temperature could be omitted, because checks failed to reveal their significance within the frame of these experiments.

The rate of uptake was determined in the following way:

Let  $n$  = number of readings,

where  $n = 10$  for 1-min. readings,

$n = 4$  for 15-min. and 1-hour readings,

$n = x$  for readings between periods of unequal duration;

$r$  = rate of uptake in (c/m) min.<sup>-1</sup>,

$t_1$  = time in minutes at the start of a class interval of  $t$  minutes,

$t_2$  = time in minutes at the end of a class interval of  $t$  minutes,

$y$  = value of equation (8).

Then the following statements can be made:

$\Delta t = 1 + (t_1 - t_2)$ , which is the time increment during each class interval, (9)

$t_m = t_1 + \frac{1}{2} \Delta t$ , which is the midpoint of a class interval, (10)

$\bar{y}_m = \frac{\sum y}{n}$ , which is the average apparent corrected activity for  $n$  readings during  $\Delta t$ . (11)

The rate of uptake can be defined as the ratio of the increments of apparent activity and of time between the midpoints of 2 class intervals. The time increment is

$$\Delta t_m = t_m' - t_m'', \quad (12)$$

and the increment of apparent activity is

$$\Delta \bar{y}_m = \bar{y}_m' - \bar{y}_m''.$$

Consequently the rate of K<sup>42</sup> uptake is

$$r = \frac{\Delta \bar{y}_m}{\Delta t_m}, \quad (13)$$

which is valid for the average time limit between the 2 class intervals

$$t_L = t_1 + \frac{1}{2} \Delta t_m \quad (14)$$

Upon substitution of all relevant expressions into equation (13), the expanded form of the rate equation becomes



$$r = \frac{\left(\frac{\Sigma y}{n}\right)' - \left(\frac{\Sigma y}{n}\right)''}{[t_1 + \frac{1}{2}(1 + t_1 - t_2)]' - [t_1 + \frac{1}{2}(1 + t_1 - t_2)]''} \quad (15)$$

This treatment of the record of the average values of leaf activity resulted in Fig. 1 for the initial 300 min. and Fig. 2 for the total ex-

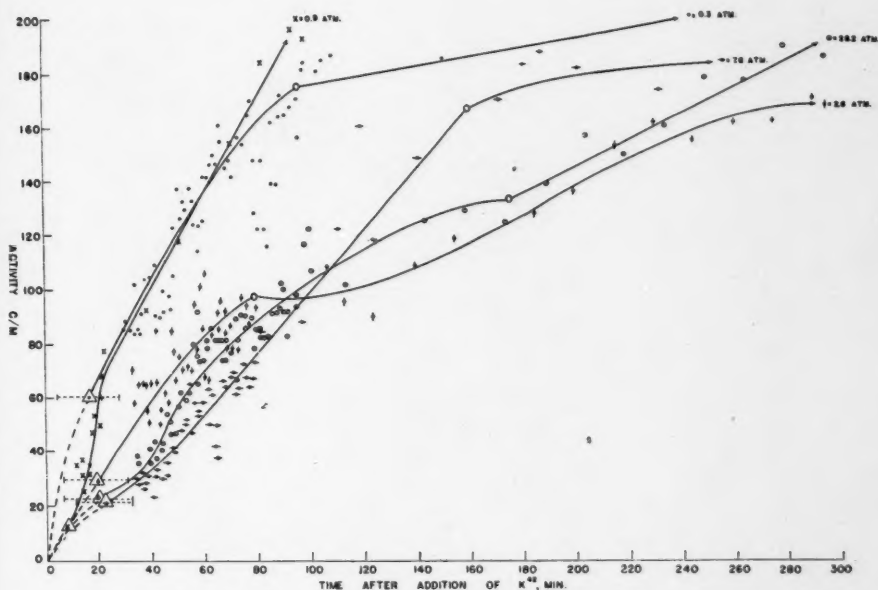


Fig. 1. Activity of  $K^{42}$  as recorded on the midvein of a leaf of the fourth pair of sunflower leaves during the first 300 min. of uptake from 5 solutions of  $K^{42}HCO_3$ . The ordinate scale allows for corrections for background, decay and instrument factors. Symbols:  $K^{42}$  concentrations as osmotic pressures in atm, 0.3 = ●, 0.9 = ×, 2.6 = ○, 7.6 = ⊙, 28.2 = ⊗. Large circles denote the graphic termination of the initial exponential period of uptake. Large triangles with a horizontal crossbar indicate the average background activity after the addition of  $K^{42}$  at  $t_0$  and before its detection in the leaf. This position serves as the origin of each freehand uptake curve through its scatter points.

perimental period of 1,800 min. They illustrate the three stages of  $K^{42}$  uptake and the exponential form of the initial stage. Its velocity constants were plotted in Fig. 3 a which demonstrates the rate reducing effect of the osmotic pressures of the higher potassium concentrations. Further analysis indicated that the velocity constant itself was related exponentially to the osmotic pressure of the potassium solution if it was  $< 5.5$  atm. Therefore the velocity constant

$$k_v = \frac{\ln (A/A_0) e^{k_p t}}{t}, \quad (16)$$

where  $k_v$  = velocity constant in  $\text{min.}^{-1}$ ,  $A$  and  $A_0$  = activities of  $\text{K}^{42}$  in the leaf at times  $t$  and  $t_0$  min., and  $k_p$  = osmotic pressure constant in  $\text{atm}^{-1}$  which equaled  $-1.89 \text{ atm}^{-1}$  in this case. At osmotic pressures  $> 5.5 \text{ atm}$  this exponential relation was changed to a function which reversed the trend from a decreasing to an increasing velocity constant.

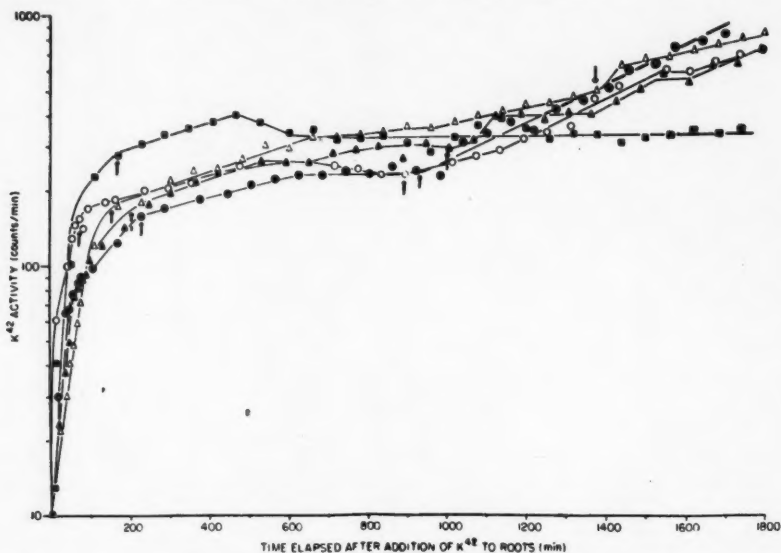


Fig. 2. Average activities of  $\text{K}^{42}$  during 1,800 min. of  $\text{K}^{42}$  uptake. The ordinate scale allows for corrections for background in the presence of the isotope before uptake, for decay and for instrument factors. Symbols:  $\text{K}^{42}$  concentrations as osmotic pressures in atm, 0.3 =  $\circ$ , 0.9 =  $\blacksquare$ , 2.6 =  $\bullet$ , 7.6 =  $\triangle$ , 28.2 =  $\blacktriangle$ . Vertical arrows denote the graphic limits of the initial, exponential period of uptake, the following saturation phase and of the final phase of renewed uptake.

Some scorching and wilting of older leaves appeared after 25 min. in the treatment by the 28.2 atm osmotic pressure solution and a few minutes later in the 7.6 atm solution. Young, terminal tissues did not exhibit damage. The amount of accumulated potassium in the leaves at the time, when these symptoms appeared first, is an index of the plant's ability to take up potassium by regulatory metabolic means. The resultant potassium content of the leaves, expressed as c/m of  $\text{K}^{42}$ , after background and decay corrections, appeared not as a direct function of osmotic pressure. Rather this concentration was a reciprocal function of the velocity constant (Fig. 3 b).

It was of interest to determine the period of time and the corresponding  $\text{K}^{42}$  activity in the leaves which were necessary to bring the initial phase

of  $K^{42}$  uptake to 99% completion when the incoming  $K^{42}$  could be assumed to equilibrate with the outgoing cations. This period could be estimated by the use of reaction half-times to be derived from velocity constants:  $T_{1/2} = 0.693/k_v$  and  $xT_{1/2} = A/T_{1/2}$ , where  $A$  = maximum experimental activity of  $K^{42}$  in the observed tissue before the time when the initial process of potassium uptake deviated from the first order rule of uptake.

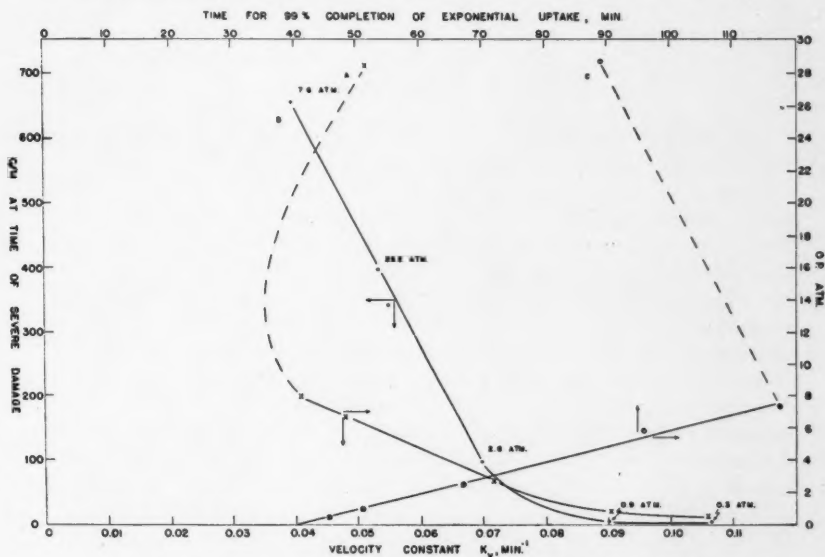


Fig. 3. Functions of osmotic pressures of the  $K^{42}HCO_3$  solutions and of the uptake velocity constants. a) Retarding influence of the osmotic pressure in atm on the first order type velocity constant in  $\text{min}^{-1}$  for the first hour of potassium uptake =  $\times$ ; b) Inverse relation between these velocity constants and  $K^{42}$  uptake in c/m by the sunflower leaves at the time when they first exhibited scorching =  $\bullet$ ; c) Illustration of the dependence of the time in min. required to complete theoretically the initial first order type phase of uptake =  $\circ$ , which was varying inversely with its velocity constants. Note: Broken curves indicate a reversal of original trends at damaging salt concentrations.

Then  $xT_{1/2}$  corresponded to a percentage of completion which could be used to find the desired theoretical end point of the exponential phase of potassium uptake. The periods for 99% completion of  $K^{42}$  uptake during the initial phase present a strict proportionality for osmotic pressures  $\leq 7.6$  atm. The remaining higher osmotic tensions reversed the trend from increasing to decreasing periods.

The equilibrium phase of  $K^{42}$  uptake, which followed the previously described phase of rapid accumulation, extended up to one day after immersion of the sunflower roots into the potassium bicarbonate solutions (Fig. 2). The duration of this phase for each potassium tension followed the

sequence  $0.3 < 2.6 < 28.2 < 7.6$  atm. An exception was the uptake from the 0.9 atm solution which did not exhibit an end of the saturation phase within the extent of this experiment.

A phase of renewed uptake followed the equilibrium phase (Fig. 2). It could be detected until approximately 40 h. after the addition of  $K^{42}$ . But values up to only 32 h. were sufficiently reliable for presentation. Stepwise potassium uptake seemed to be characteristic for the failure of a mechanism which could sustain a continuous rate of uptake.

### Discussion

The described modes of  $K^{42}$  uptake by sunflower leaves may be considered as the combined effects of salinity and of specific properties of potassium. Translocation of potassium, like that of other cations, is determined principally by the external potassium concentration, the internal cation distribution and the proportion and type of accompanying cations [10]. The  $K^+$  of potassium bicarbonate is accumulated about 2.5 times faster than  $HCO_3^-$  [8] which is reduced to a large extent and thereby raises considerably the internal  $HCO_3^-$  deficit. The resultant excess of  $K^+$  combined with a balancing loss of  $H^+$  and  $Ca^{++}$  caused possibly a fluid and smooth convex plasmolysis, which increased  $K^+$  permeability [12]. Hence a disturbance of the normal exponential uptake pattern is to be expected as indicated by the final phase of renewed and rapid uptake. Its stepwise rise suggests a distinct breakdown of the balance between  $K^+$  and other cations.

As noted in the introductory remarks, osmotic tensions of 19 atm in nutrient solutions are lethal to crop plants. Magistad and Reitemeier determined a limiting osmotic pressure of 23 atm for cessation of viability which was demonstrated in this study by scorching of leaves immediately after the transfer of plants to the 28.2 atm potassium solution. This fast response may be attributed to some extent to the unexpected high rate of potassium uptake at this high concentration when compared with the trend of decreasing rates with increasing tensions at all lower concentrations. Hence the resultant fast influx of potassium may have initiated leaf scorching already at lower quantities of accumulated  $K^{42}$  when its uptake failed to complete the hypothetical, exponential initial phase of uptake to a larger extent than the uptake from lower potassium concentrations. The findings by Schachinger and Heiss [9], which indicate that an osmotic pressure of 28 atm could inhibit anaerobic utilization of monosaccharides by 25%, may have a bearing on these observations.

Appearance of leaf wilting and scorching, when sunflower plants were subjected to the potassium bicarbonate solutions with osmotic pressures between 0.9 and 2.6 atm, confirmed observations by Hayward and others [1], [5], [6], [7] that the fresh weight yield of alfalfa was maximized at osmotic tensions of  $< 1.5$  atm. Severe yield reductions at tensions of  $> 4$  atm, as observed by them, may have been related to a new pattern of ion uptake, which was initiated in this study at about 2.6 atm. The initiation of a linear

function between velocity constant and  $K^{42}$  concentration in damaged leaves occurred at 2.6 atm which demonstrated a threshold of tissue sensitivity to salinity and/or potassium. This sensitivity expressed a delicate equilibrium of a mechanism which regulates potassium uptake. The luxury absorption of potassium above the theoretical requirements of typically exponential absorption reactions was maximized at osmotic pressures  $> 2.6$  atm, thus indicating also an equilibrium dislocation.

Strasburger [11] pointed out the regulatory function of the cortical osmotic pressure gradient in active rootlets. The epidermal osmotic pressure of *Vicia faba*, for example, was reported by him to be 0.7 atm, and the enclosed six cortical layers have a centripetal pressure gradient from 1.4 to 3.0 atm. The gradient reverses from here on to 1.7 atm in the endodermis and about 0.85 atm in the pericycle-phloemparenchyma zone. Consequently external solutions with osmotic pressures  $> 3.0$  atm could reverse the cortical osmotic gradients. Hence dessication of intra-cortical tissues may result as demonstrated in this investigation.

### Summary

The time sequential mechanism of  $K^{42}$  uptake by sunflower plants from an osmotic pressure series of  $K^{42} HCO_3$  solutions was analyzed with the aid of a localizing scintillation count-rate meter. A range of osmotic pressures from 0.3 to 28.2 atm was selected.

Three phases of potassium uptake could be distinguished; an initial, exponential, rapid uptake; a period of saturation; a final phase of renewed rapid uptake. Solutions with osmotic pressures of  $< 1.5$  atm did not cause appreciable leaf scorching but tended to reduce uptake rates. An osmotic pressure of 7.6 atm resulted in a maximum potassium accumulation in the damaged leaves. All kinetic trends were reversed at 28.2 atm, causing rapid death by dessication. Plasmolytic effects of potassium were discussed in view of uptake stimulation.

### References

- [1] Hayward, H. E., and C. H. Wadleigh, 1950: Plant Growth on Saline and Alkaline Soils. *Advances in Agronomy* 1, 1—38.
- [2] Hoagland, D. R., and D. I. Arnon, 1950: The Nutrient Culture Method for Growing Plants. Univ. Calif. Agr. Ext. Circ. 547.
- [3] International Critical Tables 4, 254—261, 1928.
- [4] Jonas, H., 1955: A localizing scintillation count-rate meter for in vivo observations of radioactivity. *Nucleonics* 13, 64—65.
- [5] Magistad, O. C., 1945: Plant Growth Relations on Saline and Alkaline Soils. *Bot. Rev.* 11, 181—230.
  - A. D. Ayers, C. H. Wadleigh, and H. C. Gaugh, 1943: Effect of Salt Concentration, Kind of Salt and Climate on Plant Growth in Sand Cultures. *Pl. Physiol.* 18, 151—166.
  - and F. F. Reitemeier, 1943: Soil Solution Concentration at the Wilting Point and Their Correlation with Plant Growth. *Soil Sc.* 55, 351—360.

- [8] Overstreet, R., S. Rubens, and T. C. Broyer, 1940: The Absorption of Bicarbonate Ion by Barley Plants as Indicated by Studies with Radioactive Carbon. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 26, 688—695.
- [9] Schachinger, L., and R. Heiss, 1951: Osmotischer Wert und Mikroorganismenwachstum in Zuckerlösungen. *Arch. Mikrobiol.* 16, 347—357.
- [10] Stout, P. R., and D. R. Hoagland, 1939: Upward Movement of Salt in Certain Plants as Indicated by radioactive Isotopes of Potassium, Sodium, and Phosphorus Absorbed by Roots. *Amer. J. Bot.* 26, 320—324.
- [11] Strasburger, E., et al., *Lehrbuch der Botanik*, p. 160—161, 1951.
- [12] Strugger, S., *Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze*, p. 105, 1949.



# **Die Aufnahme von Harnstoff und Glyzerin durch die Pflanzenzelle in Abhängigkeit von der Acidität der Außenlösung und des Zellsaftes**

Von

**Gerhard Alcer**

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin

Mit 8 Textabbildungen

*(Eingegangen am 5. September 1955)*

## **A. Einleitung**

Seit den Veröffentlichungen von Klebs, de Vries, Overton, Ruhland u. a. ist das Permeabilitätsproblem der Zelle von den verschiedensten Seiten beleuchtet worden, und man hat eine Reihe von Permeabilitätstheorien aufgestellt. Bei diesen Untersuchungen nehmen den größten Raum Arbeiten ein, die die Permeabilität des Plasmas für Anelektrolyte und ihre Beeinflussung durch Außenfaktoren behandeln. In neuerer Zeit widmen sich mehrere Arbeiten dem Einfluß des pH-Wertes des Diosmotikums und des Zellsaftes auf die Stoffaufnahme (Iljin 1928, Strugger 1935 u. f., Bünning 1936, Bogen 1938, Drawert 1938 u. f., Rottenburg 1944).

Im Anschluß an seine Untersuchungen mit sauren und basischen Farbstoffen und mit Harnstoff kommt Drawert (1948) zu der Schlußfolgerung, daß die Permeabilität der Plasmagrenzflächen für die Aufnahmegeschwindigkeit der Diosmotika in die Zellen nicht der allein bestimmende Faktor zu sein scheint. Er weist darauf hin, daß auch dem Verteilungskoeffizienten Außenmedium/Zellsaft, der durch das cH-Gefälle Außenmedium/Zellsaft und durch den Dissoziationsgrad des aufzunehmenden Stoffes bedingt ist, eine nicht zu vernachlässigende Bedeutung für die Geschwindigkeit der Aufnahme zuzuschreiben ist. Drawert kann die Feststellung treffen, daß bei gleichem pH-Wert des Außenmediums Harnstoff entsprechend seinem basischen Charakter von einer Zelle um so schneller aufgenommen wird, je „saurer“ der Zellsaft ist. Andererseits wird — in Übereinstimmung mit den Befunden von Rottenburg (1944) — bei gleichem pH-Wert des Zellsaftes Harnstoff um so schneller aufgenommen, je alkalischer das Außenmedium ist.

Den pH-Wert des Außenmediums können wir genau bestimmen und auch beliebig ändern; dies trifft aber nicht für den pH-Wert des Zellsaftes zu. Kolorimetrische Bestimmungen der Zellsaftreaktion mit Hilfe der Vitalfärbung, etwa mit Neutralrot, sind sehr unsicher, da wir nichts über den Zustand des Farbstoffes im Zellsaft wissen. Es muß also fraglich erscheinen, ob es zulässig ist, wie bisher üblich, aus dem Farbton des gespeicherten Indikators auf die cH der wässrigen Phase des Zellsaftes zu schließen (Drawert 1955). Auch pH-Bestimmungen an Preßsäften lassen keine einwandfreien Rückschlüsse auf die cH-Verhältnisse in der lebenden Zelle zu. Hier liegt einer der schwächsten Punkte in den experimentellen Voraussetzungen für die theoretischen Schlußfolgerungen, wie Drawert (1948) ausdrücklich betont. Alle Angaben über den pH-Wert des Zellsaftes, gleich mit welcher Methode sie gewonnen worden sind, sind mit einem großen Unsicherheitsfaktor belastet.

Ferner ist es fraglich, ob man die an Farbstoffen gewonnenen Erkenntnisse auf so schwach dissoziierende Substanzen wie Harnstoff übertragen kann. Dieser Einwand wurde vor allem von Bogen (1949) erhoben, da bei einer Dissoziationskonstanten von  $1,8 \cdot 10^{-14}$  es fraglich erscheinen muß, daß der Verteilungskoeffizient von Harnstoff durch eine cH-Änderung nennenswert verschoben wird. Von Bogen (1938) wird der Einfluß der cH auf die Harnstoff- und Glycerinaufnahme durch die lebende Zelle auf eine reine Änderung der Permeabilitätseigenschaften der Plasmagrenzflächen zurückgeführt.

Eine weitere Möglichkeit zur Klärung der cH-Abhängigkeit der Stoffaufnahme wird durch die Ergebnisse von Prell (1953) aufgezeigt. Der Verfasser kann nachweisen, daß kleine Mengen eines Elektrolyten, dem anelektrolytischen Diosmotikum hinzugefügt, eine zusätzliche, durch osmotische Bestimmung nicht erfassbare Wirkung ausüben. Es ist also durchaus möglich, daß den Puffersubstanzen eine den Elektrolyten bei Prell entsprechende Wirkung zuzuschreiben ist und eine cH-Abhängigkeit der Stoffaufnahme z. T. nur vorgetäuscht wird.

Ausgehend von diesen Überlegungen und von den mit Harnstoff erhaltenen Befunden von Rottenburg (1944) und Drawert (1948) sollen in der vorliegenden Arbeit durch die Heranziehung weiterer Objekte und Einbeziehung des Anelektrolyten Glycerin die experimentellen Grundlagen für den ganzen Fragenkomplex erweitert werden.

Neben den Untersuchungen an pflanzlichem Material wurde in Modellversuchen der Verteilungskoeffizient (VK) von Harnstoff in verschiedenen Medien nach den Methoden von Collander und Bärlund (1933) ermittelt. Als Versuchsobjekte dienten: *Rhoeo discolor* (Hance), *Helodea canadensis* (Casp.), *Lemna gibba* (L.), *Oedogonium* spec., *Campanula rapunculoides* (L.) und *Bryophyllum daigremontianum* (Berg.).

## B. Modellversuche

Collander und Bärlund (1933) kommen zu der Feststellung, daß eine weitgehende Parallelität zwischen dem Permeiervermögen verschiedener Nichtelektrolyte in die Zellen von *Chara ceratophylla* und der relativen Öllöslichkeit dieser Verbindungen besteht. Die relative Öllöslichkeit ist dem Permeiervermögen direkt proportional. Die Verfasser sehen in dieser Tatsache einen neuen Wahrscheinlichkeitsbeweis für die Lipoidlöslichkeitshypothese der Plasmapermeabilität, „denn wenn es sich um Adsorption an Lipoiden handeln würde, wäre wohl eine derartige quantitative Beziehung

kaum zu erwarten“. Diese Schlußfolgerung ruht auf der Annahme, daß es sich beim Übergang der Nichtelektrolyten aus der wässerigen in die Ölphase um einen Lösungsvorgang und nicht um eine lose Adsorption an irgendwelche Komponenten des Öles handelt.

Ein Beweis für einen reinen Lösungsvorgang ist erbracht, wenn das ganze System dem Henry-Nernstschen Verteilungsgesetz folgt, d. h. wenn der VK bei einer Änderung der Konzentration des Nichtelektrolyten in der wässerigen Ausgangsphase konstant bleibt. Es wurde deshalb zunächst geprüft, ob diese Voraussetzung sowohl für reines Olivenöl als auch besonders für ein Öl-Ölsäure-Gemisch zutrifft. An folgenden Kombinationen wurde der Verteilungskoeffizient für Harnstoff bestimmt:

1. für eine gleichbleibende Konzentration an Ölsäure eines Öl-Ölsäure-Gemisches (8 : 2) und wechselnder Konzentration der wässerigen Harnstofflösung;
2. für eine wechselnde Konzentration des Öl-Ölsäure-Gemisches bei gleichbleibender Konzentration der Harnstofflösung und
3. für reines Öl und Harnstofflösungen mit verschiedenen pH-Werten.

In der Versuchsanordnung richtete ich mich nach den Angaben von Collander und Bärland (1933), nur der Harnstoff wurde auf andere Weise bestimmt. Saubere 50-cm<sup>3</sup>-Weithalsflaschen mit Schliffstopfen beschickte ich mit 20 cm<sup>3</sup> Olivenöl „Merck“ (SG 4,2; VZ 194) bzw. einer Mischung von Ölsäure-Ölivenöl (beides Merck). Dann wurden 20 cm<sup>3</sup> einer wässerigen Harnstofflösung bestimmter Konzentration hinzugefügt und die Flaschen verschlossen, zugebunden und zuparaffiniert. Nachdem das Gemisch 15 Stunden auf der Schüttelmaschine sanft geschüttelt worden war, wurden die beiden Phasen durch Zentrifugieren getrennt. Die Weiterverarbeitung der Ölphase erfolgte nach 24 Stunden in der Weise, daß ein Teil des Öles mit einer trockenen Pipette abgenommen und wiederum in 50-cm<sup>3</sup>-Weithalsflaschen eingewogen wurde. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß keine Spur Harnstofflösung in die Flasche gelangte. Die mit ihrem eigenen Volumen Wasser versetzten Proben (Volumen Ölphase = Gewicht des Öles dividiert durch das spezifische Gewicht des Öles 0,91) verschloß ich in obiger Weise und ließ sie etwa 10 Stunden auf der Maschine schütteln.

Nachdem das Öl von der zweiten Wasserphase abgetrennt war, erfolgte die Bestimmung der in diese Phase übergegangenen Harnstoffmenge. Ich benutzte dazu nicht wie Collander und Bärland die Mikro-Kjeldahl-Methode, sondern die Diffusionsmethode nach Conway (Hinsberg-Lang 1951). An Stelle der dort angegebenen Diffusionsgefäße wurden Wägegler von 9 cm Durchmesser mit hineingestellten kleinen Schalen für das Borsäurereagens benutzt. Bei Verwendung dieser Gefäße läßt man zweckmäßig die Urease etwas länger (1 Std.) einwirken. Die Rücktitration der Borsäure erfolgte erst nach 15 Stunden mit 0,01 *n* HCl, bei den Versuchen mit wechselnder cH der wässerigen Lösung mit 0,005 *n* HCl. Zur Erlangung eines Wertes führte ich jeweils fünf Parallelbestimmungen aus. Der mittlere Fehler bei Bestimmung von 0,2 mg Harnstoff beträgt  $\pm 2\%$ . Parallel mit jeder Versuchsserie lief ein Blindversuch, bei dem reines Wasser mit Olivenöl bzw. Ölsäure-Ölivenöl geschüttelt wurde. Die Berechnung des VK geschah nach Collander und Bärland (1933) in folgender Weise:

Bezeichnen wir die ursprüngliche Konzentration der Wasserphase mit *a*, die analytisch bestimmte Gleichgewichtskonzentration der zweiten Wasserphase mit *b*, die nicht bestimmte Gleichgewichtskonzentration der Ölphase nach der ersten Um-

schüttelung mit  $c$  und das als konstant vorausgesetzte Verteilungsverhältnis des untersuchten Stoffes zwischen Öl und Wasserphase mit  $k$ , so erhalten wir die beiden Gleichungen:

$$\frac{c}{a-c} = k \text{ und } \frac{c-b}{b} = k$$

Wir eliminieren  $c$  und erhalten so

$$a k - 2 b k - b k^2 = b.$$

Da sowohl  $b$  wie  $k$  klein sind, kann  $b k^2$  vernachlässigt werden. Wir erhalten dann

$$k = \frac{b}{a-2b}$$

Diese Gleichung wurde zur Berechnung von  $k$  benutzt.

Versuche mit einem Gemisch von 20 Vol.% Ölsäure und 80 Vol.% Olivenöl und 2 molarer, 4 molarer sowie 6 molarer Harnstofflösung ergaben die in Tabelle 1 aufgeführten Verteilungskoeffizienten.

Tab. 1. Bestimmung des Verteilungskoeffizienten für Harnstoff zwischen Wasser und Olivenöl-Ölsäure (8 : 2) in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration.

Lösung	Bestimmung				Mittlerer	Fehler
	1.	2.	3.	Mittel		
2 mol.	0,0077	0,0071	0,0075	0,00743	$\pm 0,00017$	$\pm 2,2\%$
4 mol.	0,0070	0,0073	0,0078	0,00737	$\pm 0,00023$	$\pm 3,1\%$
6 mol.	0,0075	0,0072	0,0076	0,00743	$\pm 0,00012$	$\pm 1,6\%$

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß die VKn annähernd gleich sind. Daraus folgt, daß für das System wässrige Harnstoffphase/Ölsäure-Ölphase der Henry-Nernstsche Verteilungssatz gilt. Eine Adsorption würde nicht derartige quantitative Ergebnisse zeigen, da man annehmen kann, daß die Adsorptionsträger bei einer so hohen Harnstoffkonzentration der Ausgangslösung, wie es eine 2 molare Lösung im Verhältnis zum Aufnahmevermögen des Öles darstellt, gesättigt sind. Es könnte also auch aus 4 molarer bzw. 6 molarer Harnstofflösung keine größere Menge Harnstoff von der Ölphase aufgenommen werden, wie es in obigen Versuchen aber der Fall ist. Aus der Berechnungsformel für den VK geht ja hervor, daß bei steigender Konzentration der ersten Wasserphase auch die Gleichgewichtskonzentration der zweiten Wasserphase größer werden muß, wenn der VK in gleicher Höhe bleiben soll.

Nach der Klärung dieser Frage wurde die Abhängigkeit des VK von der  $cH$  der beiden Phasen untersucht. Nach Collander und Bärilund (1933) wird das relative Lösungsvermögen des Olivenöls durch 20%igen Ölsäurezusatz für Harnstoff auf das 35fache gesteigert. Es ist nun interessant zu erfahren, ob der Anstieg des VK dem Ölsäuregehalt des Olivenöls direkt proportional ist. Es wurden deshalb die Versuche mit einem System wiederholt, in dem die Ausgangskonzentration der wässrigen Harnstofflösung konstant 4 mol blieb, aber der Gehalt des Olivenöls an Ölsäure von 0% bis 50% gesteigert wurde. In Abb. 1 sind die erhaltenen Ergebnisse graphisch dargestellt.

Wie aus der Abb. 1 ersichtlich ist, steigt der VK proportional der Ölsäurekonzentration an. Es erhebt sich jetzt die Frage, ob aus den bisher erzielten Ergebnissen die Art und Weise des Überganges des Harnstoffs von einer Phase in die andere erklärt werden kann. Collander und Bärlund (1933, S. 91) sprechen von „Lösung“. Danach müßte man annehmen, daß die Ölsäure als Lösungsvermittler wirkt. Der Harnstoff kann als solcher gelöst werden, er kann aber auch mit der organischen Säure eine reversible Verbindung eingehen.

Drawert (1948) führt die Erhöhung des Lösungsvermögens von Olivenöl für Harnstoff durch Ölsäure auf eine cH-Vergrößerung der Ölphase zurück. Damit verbunden haben wir aber auch eine Erhöhung der hydrophilen Eigenschaften der Ölphase. Die Proportionalität des VK mit dem Ölsäuregehalt der Ölphase spricht aber doch sehr für eine chemische Reaktion.

Bogen (1949) weist darauf hin, daß es infolge der niedrigen Dissoziationskonstanten des Harnstoffs ( $1,8 \cdot 10^{-14}$ ) recht unwahrscheinlich ist, daß der VK des Harnstoffs durch eine cH-Änderung nennenswert verschoben werden kann. Es war deshalb notwendig zu prüfen, inwieweit eine Änderung der cH der wässrigen Harnstofflösung einen Einfluß auf das Lösungsvermögen des Öles für Harnstoff hat.

Mit der bei den bisherigen Versuchsserien erprobten Arbeitsmethode wurden Versuche mit reinem Olivenöl DAB 6 und mit 4 molarer gepufferter Harnstofflösung durchgeführt. Zur Verwendung kam bei diesen Arbeiten

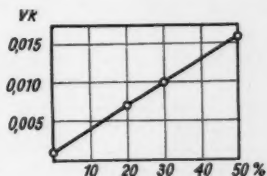


Abb. 1. Die Verteilung von Harnstoff (4 mol.) zwischen Wasser und Olivenöl-Ölsäure in Abhängigkeit von der Ölsäurekonzentration. Ordinate: Verteilungskoeffizient VK, Abszisse: Ölsäurekonzentration der Ölphase in %.

Tab. 2. Pufferzusammenstellung für Harnstofflösungen mit verschiedenem pH-Wert.

pH 3	10 cm <sup>3</sup> n/10 HCl und 0,1 g KCl und 24 g Harnstoff gelöst in Aqua dest. zu 100 cm <sup>3</sup>
pH 4	7 cm <sup>3</sup> n/10 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> und 3 cm <sup>3</sup> m/15 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 24 g Harnstoff gelöst in Aqua dest. zu 100 cm <sup>3</sup>
pH 5,7	24 g Harnstoff gelöst in Aqua dest. zu 100 cm <sup>3</sup>
pH 10	10 cm <sup>3</sup> m/15 K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> und 24 g Harnstoff gelöst in Aqua dest. zu 100 cm <sup>3</sup>
pH 10	0,2 g Borax und 24 g Harnstoff gelöst in Aqua dest. zu 100 cm <sup>3</sup>

ein anderes Olivenöl als bisher. Dieses Öl DAB 6 hatte die Konstanten SG 2,1; VZ 182,17. Die Harnstofflösungen wurden entsprechend den Angaben in Tabelle 2 hergestellt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Aus den angegebenen Verteilungskoeffizienten geht hervor, daß zwischen pH 4 und pH 5,7 keine nennenswerte Verschiebung des VK zu verzeichnen ist. Wohl ist bei Betrachtung der mittleren VKn ein leichter Anstieg zu bemerken, aber der mittlere Fehler ist doch so groß, daß dieses Ergebnis nicht gesichert erscheint. Bei

pH 10 tritt die Erhöhung des VK schon deutlicher hervor, ich glaube aber, daß diese Änderung durch den anderen Puffer bedingt ist. Bei Verwendung eines alkalischen Puffers wird immer eine geringe Verseifung auftreten, die dann das Gleichgewicht stört. Wie stark die Anwendung eines andersartigen Puffers die Ergebnisse verändert, zeigen die bei pH 3 mit HCl/KCl durchgeführten Versuche. Die erhaltenen Werte sind nicht niedriger als bei pH 4, sondern höher als alle anderen Werte. Allerdings ist dabei

Tab. 3. Die Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten Harnstoff (4 mol.)/Olivenöl DAB 6 vom pH-Wert der wässrigen Harnstofflösung.

pH-Wert der Harnstofflösung	mg Harnstoff / 100 cm <sup>3</sup> der 2. Ausschüttelung	VK	Mittl. VK	Mittl. Fehler
pH 3	20,02	0,000834	0,000882	0,000023 2,6%
	21,73	0,000906		
	21,73	0,000906		
pH 4	17,15	0,000716	0,000685	0,000010 1,5%
	15,53	0,000656		
	16,30	0,000680		
	16,73	0,000698		
	16,01	0,000668		
pH 5,7	16,01	0,000668	0,000719	0,000012 1,7%
	16,30	0,000680		
	18,30	0,000763		
	16,73	0,000698		
	17,72	0,000740		
	17,72	0,000740		
	17,15	0,000716		
	18,02	0,000751		
pH 10	19,22	0,000805	0,000815	0,000021 2,5%
	21,16	0,000895		
	18,45	0,000769		
	19,22	0,000805		
	19,36	0,000811		
	19,22	0,000805		

zu bedenken, daß Salzsäure eine stärkere Säure als Phosphorsäure ist und als solche mit verschiedenen Komponenten des Olivenöls reagieren könnte, wobei eventuell durch Freisetzung von Ölsäure die Zusammensetzung der Ölphase verschoben wird.

Abschließend kann festgestellt werden, daß die Änderung des VK bei wechselnder cH der wässrigen Phase gering ist und ihre Ursache wahrscheinlich in den durchgeführten Versuchen nicht durch die cH-Änderung, sondern durch die geänderten Puffer hervorgerufen wird.

Mit diesen Modellversuchen kann also nicht bewiesen werden, daß der VK des Harnstoffs die verschiedenen Aufnahmegeschwindigkeiten der Zellen bei geänderter cH bedingt.



Bei Betrachtung der Tabellen fällt eine Abweichung der Werte gleichartiger Versuchsserien auf, und auch mit den von Collander und Bär-lund (1933) angegebenen Zahlen verglichen, sind recht beträchtliche Unterschiede festzustellen. So hat der VK für reines Öl in Abb. 1 einen Wert von 0,001315, in Tabelle 2 ungefähr 0,00072 und bei Collander und Bär-lund 0,00015. Dieses abweichende Ergebnis wird wohl durch die Qualität des verwendeten Öles bedingt. Olivenöl hat stets einen geringen Gehalt an freien Fettsäuren. Das DAB 6 läßt einen Säuregrad bis zu 8, das bedeutet bis zu 2,25%, zu. Nun ist aber auf Grund der Ergebnisse der Ölsäureversuche anzunehmen, daß selbst geringste Ölsäurespuren einen Einfluß auf die Löslichkeit des Harnstoffs ausüben. Das von Collander und Bär-lund verwendete Öl enthielt nach ihren Angaben (1933, S. 89) 0,4% freie Fettsäuren, das entspricht einem Säuregrad von 1,4. Das von mir für die Messungen zu Abb. 1 benutzte Öl hatte einen Säuregrad von 4,2 und das für die in Tabelle 3 zusammengefaßten Versuche 2,1. Daraus ist abzuleiten, daß auch die VKn eine unterschiedliche Höhe aufweisen müssen.

## C. Versuche an Pflanzen

### 1. Methodik

Die Bestimmung der Aufnahmegeschwindigkeit von Harnstoff und Glycerin an lebendem Pflanzenmaterial wurde mit der Deplasmolysezeitmethode durchgeführt. Diese Methode hat gegenüber der plasmometrischen den Vorteil, daß zu den Versuchen auch Pflanzen mit unregelmäßigen Zellformen herangezogen werden können. Die Deplasmolysezeiten sind in Minuten angegeben und beziehen sich auf den Zeitraum zwischen dem Augenblick des Einlegens des Objektes in das Diosmotikum bis zur 90%igen Deplasmolyse seiner Zellen.

Die Untersuchungen erfolgten an Oberflächenschnitten. Es lag mir daran, das gestörte physiologische Gleichgewicht des Zellkomplexes nicht durch weitere Maßnahmen zu beeinflussen, deshalb wurden die Schnitte, soweit es nicht besonders vermerkt wird, weder entlüftet noch gewässert. Die Gefahr, daß im Zellverband noch vorhandener Sauerstoff die Resultate hätte stören können, bestand nach den Ergebnissen der auf S. 85 angeführten Versuche mit sauerstoffhaltiger und sauerstofffreier Atmosphäre nicht.

Eine Wässerung in den Pufferlösungen, wie sie Rottenburg (1944) und Krebs (1952) durchführten, hat, wie schon Drawert (1948) mitteilt und wie ich es bei speziellen Versuchen an *Campanula rapunculoides* (L.) erneut festgestellt habe, zumindest im alkalischen Bereich, eine erhebliche Zellsaftveränderung zur Folge (vgl. S. 92).

Als Diosmotika benutzte ich täglich frisch hergestellte, mit Phosphatpuffer auf verschiedene Aziditätsgrade gepufferte Harnstoff- bzw. Glycerinlösungen. Die Pufferung erfolgte entsprechend Tabelle 4 mit  $m/15$  Phosphatlösungen.

Aus Tabelle 4 folgt, daß die benutzten Lösungen 0,9 bzw. 0,45 mol. Harnstoff oder Glycerin enthielten.

Die frischen Schnitte (mit Ausnahme derjenigen von *Campanula rapunculoides* und *Lemna gibba*) wurden sofort in das jeweilige Diosmotikum überführt. Zur Aufbewahrung der gepufferten Harnstoff- bzw. Glycerinlösungen dienten kleine, mit Deckel verschlossene Schalen (Durchmesser 5 cm, Höhe 1,5 cm, Inhalt ungefähr 15 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit). Während der Dauer der Versuche blieben die Gefäße verschlossen und wurden nur zur Entnahme der Schnitte geöffnet. Es sollte da-

durch das Verdunsten von Wasser auf ein Mindestmaß gesenkt und damit eine gleichbleibende Konzentration der Diosmotika gewährleistet werden.

Die Kontrolle der Schnitte während des Versuches erfolgte in folgender Weise: Auf einen Objektträger wurde etwas Diosmotikum entsprechender Konzentration gebracht, ein Schnitt aus den Schalen auf den Objektträger überführt, mit einem Deckglas bedeckt, sofort beobachtet und dann in die Schale zurückgelegt. Die ganze Kontrolle dauerte höchstens  $1\frac{1}{2}$  Minuten. Die Beobachtung der Schnitte erfolgte bei schwacher Vergrößerung, um einen möglichst großen Zellkomplex im Blickfeld des Mikroskops zu haben.

Die Raum- und Wassertemperatur lag stets zwischen  $21^{\circ}$  und  $23^{\circ}$  C.

Bei den für Harnstoff hochpermeablen Objekten *Lemna* und *Campanula* mußte teilweise die obige Versuchsanordnung etwas geändert werden. Hier kam das

Tab. 4. Pufferzusammenstellung für Harnstoff- und Glycerinlösungen mit verschiedenen pH-Werten.

Puffermischung	Harnstoff- bzw. Glycerinlösung 1 bzw. $\frac{1}{2}$ mol.	pH (Glaselektrode)
7 cm <sup>3</sup> n/10 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> und 3 cm <sup>3</sup> m/15 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	90 cm <sup>3</sup>	3,0
3 cm <sup>3</sup> n/10 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> und 7 cm <sup>3</sup> m/15 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	90 cm <sup>3</sup>	3,4
10 cm <sup>3</sup> m/15 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	90 cm <sup>3</sup>	4,7
9 cm <sup>3</sup> m/15 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 1 cm <sup>3</sup> m/15 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	90 cm <sup>3</sup>	5,8
8 cm <sup>3</sup> m/15 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 2 cm <sup>3</sup> m/15 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	90 cm <sup>3</sup>	6,1
5 cm <sup>3</sup> m/15 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 5 cm <sup>3</sup> m/15 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	90 cm <sup>3</sup>	6,7
5,5 cm <sup>3</sup> m/15 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 4,5 cm <sup>3</sup> m/15 K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	90 cm <sup>3</sup>	7,3
5 cm <sup>3</sup> m/15 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 5 cm <sup>3</sup> m/15 K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	90 cm <sup>3</sup>	7,7
4 cm <sup>3</sup> m/15 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 6 cm <sup>3</sup> m/15 K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	90 cm <sup>3</sup>	10,0

gepufferte Diosmotikum (etwa 0,5 cm<sup>3</sup>) auf einen hohlgeschliffenen Objektträger. Die frischen Schnitte wurden nun direkt in die Lösung eingetaucht und mit einem großen Deckglas, dessen Rand schon vorher mit Vaseline bestrichen war, abgedeckt. So konnte ein Verdunsten der Harnstofflösung während des Versuches verhindert werden und eine sofortige Beobachtung einsetzen. Bei *Lemna gibba* wurde diese abgeänderte Methode bei allen pH-Stufen angewandt, bei *Campanula rapunculoides* für die Stufen pH 4–5,7. Der Luftabschluß hat auf den Ablauf der Versuche keinen Einfluß (vgl. S. 86). Eine Konzentrationsverminderung auf dem Objektträger, infolge Aufnahme von Harnstoff durch die Zellen des Schnittes, dürfte wegen der Kürze der Versuchsdauer (höchstens 4 Minuten), der Kleinheit des Schnittes (etwa 9 mm<sup>2</sup>) und der dazu verhältnismäßig großen Menge Lösung kaum eine Rolle spielen.

Alle Versuche sind in Form von Versuchsreihen durchgeführt, d. h. daß an einem Tage das Verhalten der Schnitte in allen pH-Bereichen geprüft wurde. Jede Versuchsreihe wurde von einem Exemplar gemacht (Ausnahme: *Lemna* und *Oedogonium*), da die Umweltbedingungen (Witterung, Standort, Bodenfeuchtigkeit, Alter usw.) zum Teil einen beträchtlichen Einfluß auf die Ergebnisse haben (vgl. S. 98). Alle Schnitte einer Versuchsreihe stammten aus derselben Zone des untersuchten Objektes. Da sich aber auch benachbarte Zellen verschieden verhalten können, wie Drawert (1948) an Zwiebelepidermen zeigte, und die einzelnen Schnitte nicht immer gleich dick waren, kamen je Versuchsreihe in jeder pH-Stufe fünf Schnitte zur Untersuchung.

Die Bestimmung der  $\text{cH}$  des Preßsaftes erfolgte mit pH-Spezial-Indikatorpapier von „Merk“. Ich entschied mich für diese Methode, da Preßsaftbestimmungen nur Annäherungswerte liefern können. Für *Bryophyllum daigremontianum* genügt auch eine relative Bestimmung der  $\text{cH}$ -Verschiebung.  $\text{pH(P)}$  bedeutet  $\text{pH}$ -Wert des Preßsaftes und  $\text{pH(A)} = \text{pH}$ -Wert der Auflöserlösung.

Der osmotische Wert der untersuchten Zellen wurde mit Rohrzucker als Grenzplasmolysewert ermittelt und ist jeweils als  $O_g = x \text{ mol}$  Rohrzucker angegeben.

## 2. Versuche zur Feststellung des Sauerstoffeinflusses auf die Stoffaufnahme

Collander und Holmström (1937) sowie Drawert und Endlich (1956) konnten nachweisen, daß Sauerstoffentzug die Aufnahme der Sulfosäurefarbstoffe durch Pflanzenzellen hemmt, während die Aufnahme schwach dissoziierter basischer Farbstoffe nach Drawert und Endlich auch unter anaeroben Bedingungen weitgehend normal erfolgt. Da Drawert (1948) das Verhalten der basischen Farbstoffe mit dem des Harnstoffs vergleicht und auf gewisse Parallelen hinweisen kann, war es

Tab. 5. Deplasmolysezeiten in Minuten der subepidermalen Zellen von der Blattunterseite von *Rhoeo discolor* (Mittelrippe) unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

	$\frac{1}{2}$ mol. Harnstoff			$\frac{1}{2}$ mol. Glycerin			
Luft .....	430	550	535	95	300	—	100 90
Stickstoff .....	415	550	530	85	270	225	100 95
Sauerstoff .....	425	550	535	90	270	230	95 90

Tab. 6 wie Tab. 5, aber Versuche mit den Oberepidermiszellen der Blätter von *Bryophyllum daigremontianum* durchgeführt.

	$\frac{1}{2}$ mol. Harnstoff								$\frac{1}{2}$ mol. Glycerin							
Luft .....	40	50	45	—	—	35	55	50	45	40	25	25	30	25	30	30
Stickstoff .....	35	45	40	50	40	35	45	45	30	35	25	30	30	25	25	25
Sauerstoff .....	40	40	40	45	40	35	50	50	25	40	20	25	35	25	25	20

interessant zu prüfen, ob sauerstoffhaltige und sauerstofffreie Verhältnisse auf die Aufnahme von Harnstoff und Glycerin einen Einfluß ausüben. Ich führte zu diesem Zweck Versuche an *Rhoeo discolor* und *Bryophyllum daigremontianum* durch. Die Oberflächenschnitte wurden für diese Versuche entlüftet und mit  $\frac{1}{2}$  molarer ungepufferter Harnstoff- bzw. Glycerinlösung infiltriert.

Durch die jeweils mit abgekochtem destilliertem Wasser frisch bereiteten Lösungen perlte 15 Minuten vor Versuchsbeginn Stickstoff bzw. Sauerstoff. Parallel mit diesen Versuchen liefen Kontrollen mit unbehandelter Harnstoff- bzw. Glycerinlösung. Alle Versuchsgefäße wurden im Wasserbad bei

gleicher Temperatur (21° C) gehalten. In Tabelle 5 und 6 sind die beobachteten Deplasmolysezeiten aufgeführt.

Aus den Tabellen geht hervor, daß die Aufnahmegeschwindigkeiten für Harnstoff und für Glycerin bei *Rhoeo* und *Bryophyllum* unter den angegebenen Versuchsbedingungen weder durch aerobe noch durch anaerobe Verhältnisse in irgendeiner Weise beeinflusst werden. Bei den folgenden Versuchen mit Harnstoff und Glycerin an verschiedenen Objekten brauchte also in den Versuchsanordnungen die Sauerstoffspannung nicht berücksichtigt zu werden.

Bei Harnstoff und Glycerin handelt es sich um Anelektrolyte, die als Moleküle aufgenommen werden. Vergleichsweise wurde mit derselben Versuchsanordnung auch die Aufnahme eines Elektrolyten ( $\text{KNO}_3$ ) untersucht. Ich arbeitete mit 0,3 molarer  $\text{KNO}_3$ -Lösung an *Rhoeo discolor*. Kaliumnitrat wird einerseits im Vergleich zu Harnstoff und Glycerin nur sehr langsam aufgenommen, ist aber andererseits für die Zellen schädlicher. So war bei *Bryophyllum daigremontianum*, mit dem ich anfangs arbeitete, nach 25 Stunden noch immer keine Deplasmolyse eingetreten, die Zellen waren aber bereits zu 80% abgestorben. *Rhoeo discolor* ist für Kaliumnitrat widerstandsfähiger als *Bryophyllum*. Wegen der Toxizität des Kaliumnitrats wurde aber nicht bis zur vollständigen Deplasmolyse beobachtet, sondern nach 25 Stunden der Plasmolysegrad  $G$  der unter Sauerstoff- und Stickstoff-Atmosphäre gehaltenen Schnitte bestimmt.

Die Durchschnittswerte aus 20 Messungen betrugen:

$$G_{O_2} = 0,533 \text{ und } G_{N_2} = 0,468.$$

Das Ergebnis deutet auf eine Hemmung der Kaliumnitrataufnahme bei Sauerstoffmangel hin.

### 3. Versuche über die Abhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit von Harnstoff und Glycerin vom pH-Wert der Außenlösung

#### a) *Rhoeo discolor* (Hance)

Von *Rhoeo discolor* dienten die subepidermalen Zellen von der Mittelrippe der Blattunterseite am Ende des ersten Blattdrittels als Versuchsobjekt. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß die Zellen dieses Teiles der Mittelrippe die gleichmäßigste Plasmolyseform aufweisen. Gleiche Erfahrungen teilt auch Prell (1953) mit. Der osmotische Wert der untersuchten Zellen betrug  $O_g = 0,22$  mol Rohrzucker, deshalb erfolgte die Plasmolyse mit 0,45 molaren Lösungen. Die Azidität der untersuchten Blattsschichten lag bei pH (P) 5,7. Da die bei pH (A) 3,4 plasmolysierten Schnitte in der Regel vor dem Eintritt der völligen Deplasmolyse abstarben, konnte dieser pH-Bereich für eine Auswertung nicht herangezogen werden.

Wie aus Abb. 2 hervorgeht, steigt die Aufnahmegeschwindigkeit für Harnstoff bei den subepidermalen *Rhoeo*-Zellen mit abnehmender cH an. Bei den Versuchen konnte festgestellt werden, daß die Deplasmolysezeiten

bei pH (A) 5,8 einer Schwankung unterworfen sind. Die Schnitte benötigten in drei von fünf Serien für pH (A) 5,8 eine längere bzw. gleich lange Zeit bis zum Eintritt der 90%igen Deplasmolyse als bei pH (A) 4,6. Diese Unregelmäßigkeiten können aus der Kurve nicht direkt abgelesen werden.

Die Deplasmolysezeiten für Glycerin beweisen erneut, daß *Rhoeo discolor* ein ausgesprochener Glycerintyp ist (Fitting 1915, Bärlund 1929, Bogen 1940). In den Versuchsreihen mit Harnstoff wurde beobachtet, daß sich der Farbton der anthocyanführenden Zellen in den extremen pH (A)-Bereichen über pH (A) 7,7 allmählich nach Blaurot und unterhalb pH (A) 4,6 nach kräftig Rot änderte. Bei den Glycerinversuchen trat diese Farbtonänderung nur im sauren Bereich ein, im alkalischen war sie nicht zu beobachten.

b) *Helodea canadensis* (Casp.)

Für die Versuchsreihen mit *Helodea canadensis* wurden jeweils Blättchen dicht benachbarter Wirtel eines Sprosses benutzt. Da die einzelnen Zonen des *Helodea*-Blattes sich ganz verschieden verhalten (Moder 1932, Drawert 1948), beobachtete ich immer die Zellen der Blattmitte in der Nähe der Mittelrippe. Besonderer Wert wurde bei dem Arbeiten mit *Helodea* auf Einhaltung temperaturkonstanter Bedingungen gelegt, denn es stellte sich bald heraus, daß dieses Objekt in besonders hohem Maße durch Temperaturschwankungen zu beeinflussen ist. Eine Temperaturerhöhung um 5° C bewirkte eine Verkürzung der ursprünglichen Deplasmolysezeit auf etwa die Hälfte. So betrugen die Werte für Harnstoff an der Unterepidermis für pH (A) 4,8 bei 15° = 100 Minuten, bei 20° = 47 Minuten und bei 26° = 28 Minuten. Der osmotische Wert der untersuchten Zellkomplexe lag für die Oberepidermis bei  $O_g = 0,36$ , für die Unterepidermis bei  $O_g = 0,40$  mol Rohrzucker. Der mit etwas abgekochtem destilliertem Wasser versetzte Gewebeprei der entkalkten *Helodea*-Blättchen ergab mit der Glaselektrode gemessen einen pH-Wert von 4,91.

Wie die Kurven in Abb. 3 und 4 belegen, haben wir es bei *Helodea canadensis* mit einem ausgesprochenen Harnstofftyp zu tun. Harnstoff permeiert sowohl in der Oberepidermis als auch in der Unterepidermis wesentlich schneller als Glycerin. Die Feststellung von Drawert (1948), daß Harnstoff von den Unterepidermiszellen schneller aufgenommen wird als von den Oberepidermiszellen, kann ich bestätigen und noch hinzufügen, daß dieses auch für Glycerin zutrifft.

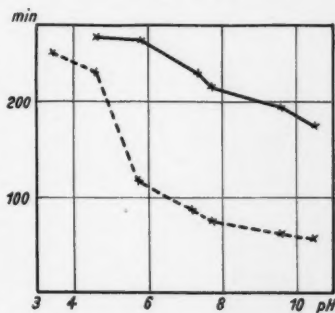


Abb. 2. Deplasmolysezeiten der subepidermalen Zellen in der Mittelrippe des Blattes von *Rhoeo discolor* in 0,45 mol. Lösungen von Harnstoff (—) und Glycerin (---) bei verschiedenen pH-Werten der Außenlösungen. Ordinate: Zeit in Min., Abszisse: pH-Werte.

Die Aufnahmegeschwindigkeit für Harnstoff nimmt sowohl bei der Oberepidermis als auch bei der Unterepidermis vom sauren zum alkalischen

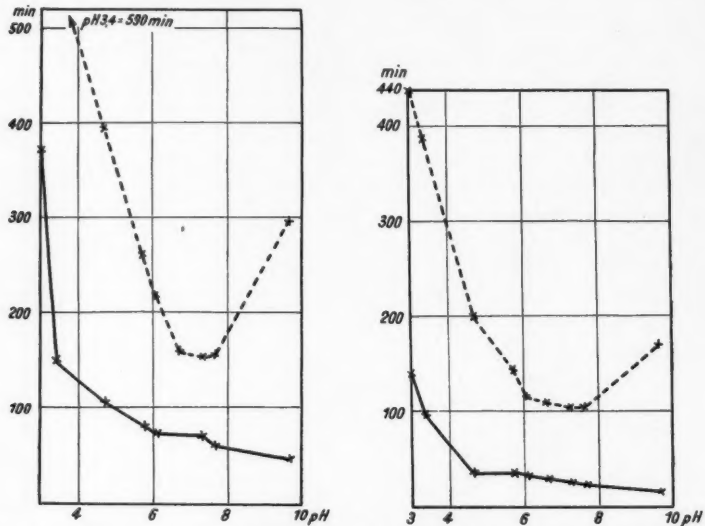


Abb. 3. Deplasmolysezeiten der Zellen der Blattoberseite von *Helodea canadensis* in 0,9 mol. Lösungen von Harnstoff (—) und Glycerin (----) bei verschiedenen pH-Werten der Außenlösungen. Ordinate: Zeit in Min., Abszisse: pH-Werte.

Abb. 4 wie Abb. 3, nur Zellen der Blattunterseite von *Helodea canadensis*.

Bereich hin zu. Für Glycerin steigt die Aufnahmegeschwindigkeit zunächst vom sauren zum neutralen Bereich auch an, fällt aber dann im alkalischen Bereich wieder ab.

#### c) *Lemna gibba* (L.)

Von *Lemna gibba* dienten die Wurzeln als Versuchsobjekt. Das benötigte Pflanzenmaterial wurde mir von Herrn Dr. R. Kandeler aus seinen Kulturen in freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Nach Pirson und Seidel (1950) ist die Aufnahmegeschwindigkeit in den einzelnen Zonen der Wurzel verschieden und hängt auch vom Alter ab. Um unter immer gleichen Bedingungen zu arbeiten, beobachtete ich jeweils die Zone unmittelbar hinter der Wurzeltasche. Der Wurzelpreßsaft hatte einen pH-Wert von 6,2–6,4. Der osmotische Wert der untersuchten Zellen betrug 0,23 mol Rohrzucker. Die Plasmolyse und Deplasmolyse erfolgte in 0,45 molaren Lösungen.

In Vorversuchen konnte festgestellt werden, daß *Lemna gibba* ein rapider Harnstofftyp ist, deshalb kam bei den Messungen mit Harnstoff die auf S. 84 beschriebene, abgeänderte Arbeitsmethode zur Anwendung.

Wie Marklund (1936) und Pirson und Seidel (1950) angeben,



liegt die Glycerinpermeabilität wesentlich unter der Harnstoffpermeabilität; ich kann diesen Befund bestätigen. Wie die Kurven in Abb. 5 zeigen, ist die *Lemna*-Wurzel um vieles mehr für Harnstoff als für Glycerin permeabel (bei pH 4,7 Harnstoff = 3,8 Minuten, Glycerin = 40 Minuten). Die Harnstoffkurve zeigt einen kontinuierlichen Verlauf, sie fällt vom sauren zum alkalischen Bereich hin ab. Ebenso verhält sich die Glycerinkurve, allerdings weist sie bei pH 7,3 Unregelmäßigkeiten auf.

d) *Oedogonium spec.*

Rottenburg (1944) berichtet, daß die Aufnahmegeschwindigkeit bei *Zygnema* durch eine Änderung der Außen-cH nicht beeinflusst wird und glaubt, daß *Zygnema* als Wasserpflanze an das jeweils sie umgebende Wasser anpassungsfähig sein muß. Sollte diese Vorstellung zutreffen, dann müßte sich eine ähnliche Beobachtung auch an anderen Wasserpflanzen, zumindest an Algen, machen lassen. Ich führte deshalb Versuche mit einer *Oedogonium*-Art durch. Das verwendete Material wurde aus einem Teich des hiesigen Botanischen Gartens entnommen. Der osmotische Wert der untersuchten Zellen lag bei 0,30 mol Rohrzucker, so konnte mit 0,45 molaren Lösungen plasmolysiert werden. Die Plasmolyse trat in den einzelnen Fäden rasch ein. Die cH des Standortwassers wurde mit Indikatorpapier gemessen, sie lag bei pH 6,1.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß *Oedogonium* ein ausgesprochener Harnstofftyp ist. Der Harnstoff wird etwa fünfmal schneller aufgenommen als das Glycerin. Wie Abb. 6 erkennen läßt, ist bei *Oedogonium* die Aufnahmegeschwindigkeit stark durch die Reaktion des umgebenden Mediums beeinflusbar.

Sowohl die Harnstoff- als auch die Glycerin-Deplasmolysezeitkurve weist ein Optimum auf. Die Kurven steigen vom sauren Bereich bis zum pH-Wert 5,8 an und fallen vom pH 6,2 zum alkalischen Bereich hin ab.

Meine Versuchsergebnisse lassen klar erkennen, daß *Oedogonium* nicht zu dem von Rottenburg aufgestellten Außen-cH-unabhängigen Typ gehört. Wenn Rottenburg (1944) und Krebs (1952) bei den Konjugaten eine Indifferenz gegenüber der cH feststellten, dann handelt es sich also entweder um spezifische Eigenschaften dieser Klasse, oder die von den beiden Verfassern durchgeführte Pufferwässerung läßt fehlerhafte Ergebnisse entstehen. Bei den folgenden Untersuchungen an *Campanula* (S. 92) soll darauf noch eingegangen werden.

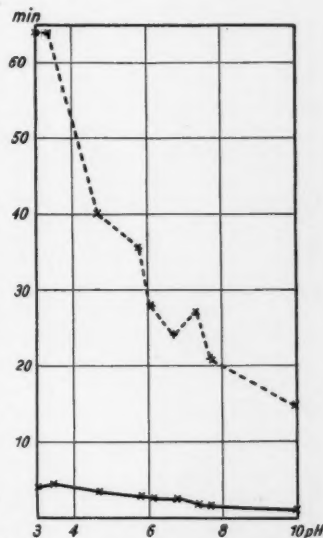


Abb. 5. Deplasmolysezeiten der Epidermiszellen der Wurzel von *Lemna gibba* in 0,45 mol. Lösungen von Harnstoff (—) und Glycerin (---) bei verschiedenen pH-Werten der Außenlösungen. Ordinate: Zeit in Min., Abszisse: pH-Werte.

e) *Campanula rapunculoides* (L.)

Nach den Angaben von Rottenburg (1944) tritt bei *Campanula trachelium* (L.) im Gegensatz zu zahlreichen anderen Pflanzen die Deplasmolyse bei saurer Außenreaktion eher ein als bei alkalischer. Wie die von mir erhaltenen Ergebnisse belegen, verhält sich auch *Campanula rapunculoides* (L.) genau so wie *Campanula trachelium*, die mir für meine Untersuchungen nicht zur Verfügung stand.

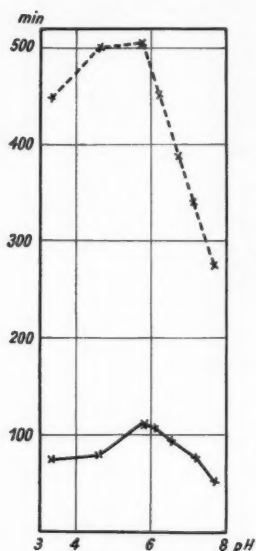


Abb. 6. Deplasmolysezeiten der Zellen von *Oedogonium* in 0,45 mol. Lösungen von Harnstoff (—) und Glycerin (---) bei verschiedenen pH-Werten der Außenlösungen. Ordinate: Zeit in Min.. Abszisse: pH-Werte.

Im Frühjahr und im Sommer 1952 sowie im Februar 1953 führte ich Untersuchungen zur Bestimmung der Harnstoff- und Glycerinaufnahmegeschwindigkeit an *Campanula rapunculoides* durch. Das Material entnahm ich schattigen Stellen unseres Versuchsgartens bzw. einer Gewächshauskultur. Es kamen Schnitte der rotgefärbten subepidermalen Stengelzellen noch nicht blühender Pflanzen zur Anwendung. Der osmotische Wert der beobachteten Zellen betrug 0,40 mol Rohrzucker, der pH-Wert des Zellsaftes schwankte zwischen 5,8 und 6,2. Die beiden Diosmotika Harnstoff und Glycerin wurden in 0,90 molarer Konzentration benützt.

Die subepidermalen Zellen des Stengels von *Campanula rapunculoides* sind für Harnstoff derart hochpermeabel, daß wie bei den *Lemna*-Wurzeln die auf S. 84 angegebene Methode benutzt werden mußte.

Die Harnstoffplasmolyse trat in allen Zellen gleichmäßig ein. In kürzester Zeit war eine vollkommene Konvexpasmolyse erzielt, im sauren Bereich eher als im alkalischen. Sodann ging die Plasmolyse gleichmäßig zurück, und nach 2,5 (im sauren Bereich) bis 12 Minuten (im alkalischen Bereich) war vollständige Deplasmolyse eingetreten. Bei diesen Versuchen erwies es sich besonders klar, daß die Deplasmolysezeitmethode bei hochpermeablen Objekten der plasmometrischen überlegen ist. Rottenburg mußte, um überhaupt Messungen vornehmen zu können, mit 2 molarer Harnstofflösung arbeiten, und ihre erhaltenen Werte zeigen auch dann noch starke Streuungen. Mit der Plasmolysezeitmethode erhielt ich auch bei Anwendung 0,90 molarer Lösungen — abgesehen von den jahreszeitlichen Schwankungen, die noch diskutiert werden sollen — gleichbleibende Ergebnisse. Die graphische Darstellung der Deplasmolysezeiten ergibt eine Kurve (Abb. 7), die von pH (A) 3 nach pH (A) 10,5 ansteigt, d. h. also die Aufnahmegeschwindigkeit nimmt mit steigendem pH-Wert ab. Die Kurve zeigt einen kontinuierlichen Verlauf.

Die subepidermalen Stengelzellen von *Campanula rapunculoides* nehmen Glycerin wesentlich langsamer auf als Harnstoff, was aus einem Vergleich der Kurven in Abb. 7 leicht ersehen werden kann. Deshalb konnte bei den Versuchen mit Glycerin mit der gewöhnlichen Methode gearbeitet werden. Bei den Glycerinversuchen lagen die Deplasmolysezeiten zwischen 30 und 85 Minuten. Die Kurve, die aus diesen Versuchen resultiert, weist größere Unregelmäßigkeiten auf. Sie fällt vom stark sauren pH-Bereich zum pH-Wert des Preßsaftes ab, steigt dann plötzlich an und fällt ab pH 7,3 wieder.

Während der Versuche mit Glycerin nahm das Anthocyan der Schnitte, die in einem Plasmolytikum mit einem pH-Wert  $< 4,7$  lagen, einen stark dunkelroten, und das derjenigen in den Lösungen über pH 7,5 einen blauvioletten Farbton an, noch ehe die Zellen völlig deplasmolysiert waren. Die sich blauviolett färbenden Zellen im alkalischen Bereich wiesen kürzere und unregelmäßigere Deplasmolysezeiten auf als Zellen, die in einigen Versuchen keine Umfärbung zeigten. Das Optimum bei pH 6,6 trat bei acht von zwölf Messungen auf und ist wohl nicht auf einen Fehler der Versuchsanordnung zurückzuführen.

An *Campanula rapunculoides* ließ sich besonders gut eine Veränderung der Aufnahmegeschwindigkeit mit der Entwicklung der Pflanze feststellen. Junge Exemplare plasmolysierten in der Regel schneller als ältere. Bei blühenden Pflanzen trat erst im 2 molaren Diosmotikum eine einwandfreie Plasmolyse ein. Allerdings werden diese Erscheinungen, wenigstens zum Teil, mit den unterschiedlichen osmotischen Werten zusammenhängen. Bei jungen Pflanzen lag  $O_g$  bei 0,38 und stieg bei blühenden bis zu 0,66 mol Rohrzucker. Für diese Vermutung spricht ferner die Beobachtung, daß im Mai 1954 auch noch nicht blühende Pflanzen mit  $O_g = 0,62$  mol Rohrzucker in 1 molaren Lösungen sich nicht plasmolysieren ließen.

Rottenburg (1944) wässerte die Schnitte vor der Plasmolyse bis zu 24 Stunden in den Pufferlösungen, um sie erst dann in das Diosmotikum zu überführen. Drawert (1948) hat ausführlich auf die durch diese

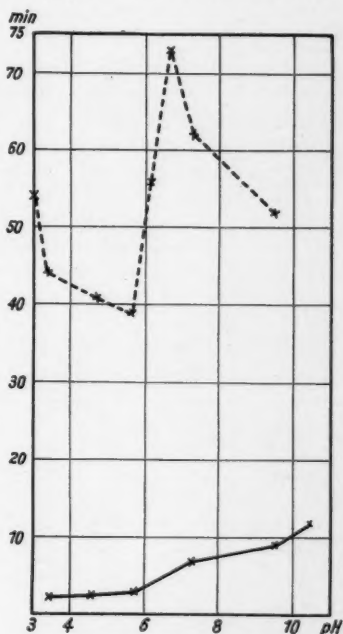


Abb. 7. Deplasmolysezeiten der subepidermalen Zellen des Stengels von *Campanula rapunculoides* in 0,9 mol. Lösungen von Harnstoff (—) und Glycerin (---) bei verschiedenen pH-Werten der Außenlösungen. Ordinate: Zeit in Min., Abszisse: pH-Werte.

Methode bedingten Fehler hingewiesen. Da aber neuerdings wieder eine Arbeit erschienen ist, die von dieser Vorbehandlung Gebrauch macht (Krebs 1952), soll hier nochmals auf diese Frage eingegangen werden.

Aus den oben angegebenen Versuchen zur Untersuchung der Glycerinaufnahme von *Campanula rapunculoides* geht bereits hervor, daß die Puffersubstanzen mit dem Diosmotikum in die Zellen eindringen und die  $\text{cH}$  des Zellsaftes ändern müssen, da ein Farbumschlag des Anthocyans auftrat. Eingehende Prüfungen ergaben, daß eine einstündige Wässerung frischer Schnitte in reinen Pufferlösungen mit pH 10,5 eine Umfärbung der roten subepidermalen Stengelzellen nach Blaurot bis Violett bewirkte. Eine Kombination der alkalischen Pufferlösung mit Rohrzuckerlösung führte zu einer zwar schwächeren, aber doch sichtbaren Änderung des Farbtons der

Tab. 7. *Deplasmolysezeiten subepidermaler Stengelzellen von Campanula rapunculoides in 0,9 mol Harnstoff mit verschiedenem pH-Wert nach einer vorhergehenden dreistündigen Wässerung der Schnitte in 0,0015 mol.  $\text{K}_3\text{PO}_4$ -Lösung mit pH 8.*

pH	Deplasmolysezeit in sec	pH	Deplasmolysezeit in sec
4,5	105	7,4	90
5,4	240	9,9	80
6,0	160	10,0	70

Zellen nach 30–60 Minuten Einwirkung. In weiteren Versuchen prüfte ich das Verhalten frischer Schnitte nach erfolgter Vorbehandlung nach der Methode von Rottenburg (1944) mit 0,0015 mol.  $\text{K}_3\text{PO}_4$ -Lösung (pH-Wert der Lösung = 8). Auch bei dieser Pufferwässerung schlug der rote Farbton des Anthocyans nach Blau um. Zur Deplasmolyse in ungepufferter 1 molarer Harnstofflösung benötigten diese Schnitte eine dreimal so lange Zeit wie unbehandelte: unbehandelte = 115 Sekunden, mit  $\text{K}_3\text{PO}_4$  vorbehandelt = 370 Sekunden. In gepufferten Harnstofflösungen lieferten die vorbehandelten Schnitte völlig andere Werte, als aus allen bisherigen Messungen an unbehandeltem Material zu erwarten gewesen wäre. Bei unbehandelten Schnitten von *Campanula rapunculoides* nahm die Aufnahmegeschwindigkeit mit steigender  $\text{cH}$  (A) ab. Die vorbehandelten Schnitte deplasmolysierten dagegen in Harnstofflösungen oberhalb pH 7 schneller als in den sauren Lösungen. Als Beispiel soll eine Versuchsreihe vom 11. Juni 1952 angeführt werden: Schnitte subepidermaler rotgefärbter Stengelzellen wurden 3 Stunden in 0,0015 mol.  $\text{K}_3\text{PO}_4$ -Lösung (pH 8) gewässert, anschließend kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und in gepufferte Harnstofflösung übertragen. Die in Tabelle 7 aufgeführten Deplasmolysezeiten wurden beobachtet.

Andere Versuchsreihen verliefen ähnlich oder zeigten im alkalischen Bereich eine gleichbleibende Deplasmolysezeit, wieder andere erfuhren trotz Umfärbung des Zellsaftes keine Abweichung von den Kurvenbildern unbehandelter Versuchsreihen. Auch die Intensität der Umfärbung des Anthocyans im Zellsaft von Rot nach Blauviolett war verschieden stark.

Daraus ergibt sich, daß eine Vorbehandlung der Schnitte in der Weise, wie sie von Rottenburg und Krebs durchgeführt wurde, mindestens im alkalischen Bereich eine Veränderung des physiologischen Zustandes der Zellen zur Folge hat. Wenn Krebs von den jeweils angegebenen zwei Versuchen einen als pH-abhängig, den anderen als unabhängig registrieren kann, so sehe ich aus den oben aufgezeigten Gründen keine Notwendigkeit, die pH-unabhängigen Messungen als gültig ansehen zu müssen.

#### 4. Versuche über die Abhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit von Harnstoff und Glycerin vom pH-Wert des Zellsaftes

Bei allen bisherigen Untersuchungen wurde nur die cH des Außenmediums verändert; es sollten nun auch Messungen bei veränderter cH des Zellsaftes durchgeführt werden. Dazu erschien *Campanula* als geeignetes Objekt, da es, wie aus den vorhergehenden Versuchen ersichtlich ist, sowohl Harnstoff als auch andere Stoffe rasch aufnimmt.

##### a) Versuche, die Zellsaft-cH künstlich zu ändern

Ich prüfte das Verhalten frischer *Campanula*-Schnitte nach erfolgter Vorbehandlung mit  $\text{NH}_3$  und  $\text{CO}_2$ . Die Schnitte wurden 3 Stunden in mit  $\text{CO}_2$  durchperltem Wasser bzw. in einer wässrigen Lösung von 0,02/100  $\text{NH}_4\text{OH}$  gewässert. Genau wie bei den gleichzeitig durchgeführten und oben beschriebenen Versuchen mit  $\text{K}_3\text{PO}_4$  schlug auch bei der Ammoniakwässerung der Farbton des Anthocyans der Zellen von Rot nach Blauviolett um. Bei den mit  $\text{CO}_2$  behandelten Schnitten war keine Umfärbung (nach Dunkelrot) zu beobachten. Die Schnitte wurden dann mit destilliertem Wasser kurz gewaschen und in die verschiedenen gepufferten  $\text{NH}_3$ - bzw.  $\text{CO}_2$ -freien Harnstofflösungen überführt. Diese Versuchsreihen lieferten aber keine einwandfreien Ergebnisse, da 1. die Messungen große Schwankungen aufwiesen und 2. das  $\text{NH}_3$  schon während der Plasmolyse, jedoch auf jeden Fall noch vor Eintritt der Deplasmolyse, wieder aus den Zellen ausdiffundierte, wie aus der Rückfärbung des Anthocyans von Blauviolett nach Rot ersichtlich war. Das Verhalten des  $\text{CO}_2$  konnte infolge fehlender Kontrollmöglichkeiten nicht beobachtet werden. Deshalb wurden die Versuche abgebrochen.

Bogen (1938) führte ähnliche Arbeiten an *Sanchezia nobilis* und *Pelargonium zonale* durch. Da er aber  $\text{NH}_3$  bzw.  $\text{CO}_2$  gleichzeitig mit Harnstoff einwirken ließ, können diese Arbeiten hier nicht zum Vergleich herangezogen werden.

Nach Keyssner (1931) und Virtanen (1932) kann man die Preßsaft-cH einer Pflanze durch Anzucht in verschiedenen gepufferten Nährlösungen ändern. Ich zog nach Pirschle (1929) bei einer cH der Nährlösung von pH 3,8 und pH 7,7 *Helianthus annuus* aus Samen und *Tradescantia zebrina* aus Stecklingen. Die cH des Wurzelpreßsaftes der so gezogenen Pflänzchen zeigte jedoch nur einen Unterschied von 0,3-pH-Einheiten, und die durchgeführten Messungen der Deplasmolysezeiten ließen nur geringe und durchaus nicht gesetzmäßige Unterschiede erkennen. Diese Versuche waren also wenig erfolgversprechend und wurden deshalb nicht weitergeführt.

##### b) Versuche mit *Bryophyllum daigremontianum* (Berg.)

Aus den bisher erhaltenen Ergebnissen geht hervor, daß die Versuche, die cH des Zellsaftes durch physikalisch-chemische Methoden auf längere Zeit zu ändern, ohne Erfolg blieben. So war es naheliegend, Objekte zu

verwenden, die im Verlauf ihres Stoffwechsels pH-Änderungen aufweisen. Diese Voraussetzungen finden sich bei den Sukkulenten erfüllt. Bekanntlich nimmt der Säuregehalt des Zellsaftes nachts zu, so daß der Zellsaft am Morgen saurer ist als am Abend. Gustafson (1925) hat den Säurestoffwechsel von *Bryophyllum calycinum* genau untersucht. Ich arbeitete mit *Bryophyllum daigremontianum*. Nach Wolf (1932) ist bei *Bryophyllum calycinum* von den jüngeren zu den älteren Blättern eine titrimetrisch zu erfassende Aciditätszunahme festzustellen. Meine eigenen Vorversuche an *Bryophyllum daigremontianum* zeigten, daß bei dieser Art auch die mit Indikatorpapier bestimmte aktuelle Acidität des Preßsaftes von den jüngeren zu den älteren Blättern zunimmt, und daß sie bei den besonders stark wachsenden oberen Blättern größeren Schwankungen unterworfen ist. Deshalb kamen jeweils Schnitte der Oberepidermis aus der Blattmitte der Blätter des 4. Wirtels von oben zur Untersuchung. Je nach der Sonneneinstrahlung konnte morgens ein Preßsaft-pH-Wert von 4,2–4,4 und abends von 5,0–6,0 gemessen werden. Der Preßsaft der Epidermis verhielt sich dabei ebenso wie der Preßsaft des ganzen Blattes. In den Sommermonaten stellte sich das Maximum des pH-Wertes gegen 14 Uhr ein, nach 17 Uhr fiel der Preßsaft-pH-Wert oft bereits wieder ab. Gustafson (1925) teilt für das von ihm untersuchte *Bryophyllum calycinum* ein pH-Maximum um 16 Uhr mit. Bei meinen Versuchen lag also im günstigsten Fall ein pH-Unterschied von 1,6–1,8 Einheiten vor. Eine Vergrößerung dieses Gefalles durch künstliche Verlängerung der Nacht oder des Tages durch längere Verdunkelung bzw. Zusatzbeleuchtung gelang nicht. Nach zehntägiger Verdunkelung stellte sich nur ein Minimum von pH 4,4 ein.

Mit der Änderung des pH-Wertes lief auch, wie nicht anders zu erwarten war, eine Änderung des osmotischen Wertes parallel. Bei pH (P) 4,4 lag der osmotische Wert im September zwischen 0,29 und 0,31 bei pH (P) 6 war er auf 0,23–0,25 mol Rohrzucker abgesunken. Im Februar 1953 wurden niedrigere osmotische Werte gemessen. Sie betrugen für pH (P) 4 = 0,21–0,23, für pH (P) 6 = 0,16–0,18 mol Rohrzucker. Entsprechend der jahreszeitlichen Änderung des osmotischen Wertes änderte sich auch die Aufnahmegegeschwindigkeit für Harnstoff. Bei pH 7 benötigten die Schnitte in 0,45 mol. Harnstofflösungen folgende Zeiten zur Deplasmolyse:

am 11. September 1952	100 Minuten
7. Oktober 1952	135 Minuten
11., 12. und 16. Februar 1953	180 Minuten

Ein über längere Zeit im August/September 1952 durchgeführter Vergleich des pH-Wertes mit dem osmotischen Wert zeigte aber, daß die Änderung der beiden Werte oft voneinander unabhängig verläuft.

Die Versuche wurden mit 0,45 molaren Harnstoff- bzw. Glycerinlösungen durchgeführt und die Deplasmolysezeiten in Minuten gemessen. Die Raum- und Wassertemperaturen spielten bei diesen Untersuchungen wieder eine große Rolle. So war die Deplasmolysezeit bei einer Temperatur von 30° C nur etwa halb so lang wie bei 21° C. Die Messungen wurden bei einer Zimmer- und Wassertemperatur von 21° C durchgeführt. Die Plasmolyse trat in allen Zellen gleichmäßig ein.



Aus einem Vergleich der Harnstoff- mit den Glycerinwerten geht hervor, daß die Zellen der Oberepidermis von *Bryophyllum daigremontianum* Glycerin etwas schneller aufnehmen als Harnstoff. Der Unterschied ist nicht so stark wie bei *Campanula* oder *Helodea*, tritt aber als solcher doch in Erscheinung. Der Verlauf der Harnstoff- und der Glycerinkurve ist, wie die Abb. 8 zeigt, annähernd parallel. Beide Kurven können also zusammen behandelt werden; wir kommen dann zu folgender Schlußfolgerung:

Läßt man den pH-Wert des Preßsates außer Betracht, so ergibt sich für das Verhältnis Deplasmolysezeit/cH-Außenlösung, daß die Deplasmolysezeit mit fallender cH (A) abnimmt. Hatte das Diosmotikum pH 3, so starben die Zellen in 30% der Versuche noch vor dem Eintritt der völligen Deplasmolyse ab. Bei stark alkalischer Reaktion der Außenlösung war dies nicht der Fall. Das Absterben im sauren Bereich trat sowohl bei den Morgen- als auch bei den Abendmessungen ein. Bei pH 3 dürften die Zellen so stark geschädigt sein, daß die für diese pH-Stufe gewonnenen Werte nicht mit zum Vergleich herangezogen werden können. Wie aus den Kurven in Abb. 8 hervorgeht, hat auch der pH-Wert des Preßsates einen Einfluß auf die Aufnahmegeschwindigkeit von Harnstoff und Glycerin durch die Epidermiszellen. Für die Zellen mit einem höheren Preßsaft-pH-Wert ergibt sich eine längere Deplasmolysezeit als für die mit niedrigerem pH-Wert.

Um aus diesen Ergebnissen jedoch Schlußfolgerungen ziehen zu können, muß auch der Unterschied im osmotischen Wert berücksichtigt werden. Das osmotische Gefälle Diosmotikum/Zellsaft beträgt bei pH (P) 4,2 im Mittel 0,22 Einheiten, bei pH (P) 6 dagegen 0,33 Einheiten, demzufolge muß bei pH (P) 6 auch eine längere Deplasmolysezeit zu verzeichnen sein als bei pH (P) 4,2. Legt man die gemessenen Zeiten bei pH (P) 4,2 zugrunde, so lassen sich die theoretischen Deplasmolysezeiten für pH (P) 6 errechnen, unter der Voraussetzung, daß die cH des Preßsates keinen Einfluß auf die Stoffaufnahme hat.

Der Tabelle 8 ist zu entnehmen, daß die errechneten Zeiten von den gemessenen abweichen, und zwar sind letztere größer. Durch diese Gegenüberstellung wird die obige Feststellung unterstützt, daß bei *Bryophyllum*

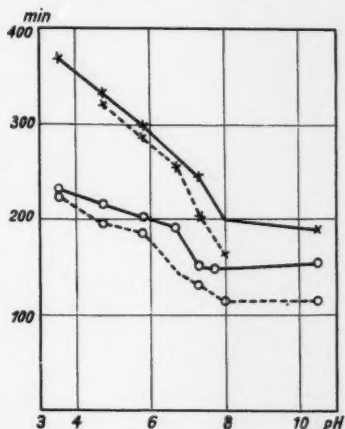


Abb. 8. Deplasmolysezeiten der Oberepidermiszellen der Blätter von *Bryophyllum daigremontianum* in 0,45 mol. Lösungen von Harnstoff (—) und Glycerin (---) bei verschiedenen pH-Werten der Außenlösungen und in Abhängigkeit vom pH-Wert des Preßsates: —o— = pH ~ 4,2 und —x— = pH ~ 6. Ordinate: Zeit in Min., Abszisse: pH-Werte der Außenlösung.

*daigremontianum* die Aufnahmegeschwindigkeit der Epidermiszellen für Harnstoff und Glycerin mit fallender cH des Preßsaftes abnimmt.

Zu Messungen im März 1953 verwendete ich ein *Bryophyllum daigremontianum* mit Zellen, deren Zellsaft teilweise durch Anthocyan schwach rötlich gefärbt war.

Tab. 8. Vergleich der berechneten und der gemessenen Deplasmolysezeiten für Harnstoff in Minuten.

pH (A)	Gemessene Zeiten pH (P) 4,2	Gemessene Zeiten pH (P) 6	Errechnete Zeiten pH (P) 6
3,5	234	367	276
4,7	217	334	256
5,8	205	299	241
6,7	191	—	(225)
7,3	152	245	179
7,7	150	200	177
10,5	155	190	182

Während der Deplasmolyseversuche trat auch in den *Bryophyllum*-Zellen in derselben Weise wie bei *Campanula rapunculoides* sowohl im sauren als im alkalischen Bereich ein Farbumschlag ein. Mit dem Farbton änderte sich auch die Deplasmolysezeit.

### 5. Versuche mit verschiedenen Pufferkombinationen bei cH-Gleichheit

Wie die bisherigen Ergebnisse wiederholt zeigen, ist das Eindringen der Puffersubstanzen zusammen mit dem Plasmolytikum in die Zellen von nicht zu unterschätzender Bedeutung. Ich wollte deshalb abschließend prüfen

Tab. 9. Verschiedene Puffermischungen für die pH-Stufen 4,2, 4,7 und 7,4.

Zusammensetzung der Puffergemische	$\frac{1}{2}$ mol. Harnstofflösung	pH
4 cm <sup>3</sup> 0,1 mol Citronensäure und 6 cm <sup>3</sup> m/15 Natriumcitrat	90 cm <sup>3</sup>	4,2
1 cm <sup>3</sup> m/10 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> und 9 cm <sup>3</sup> m/15 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	90 cm <sup>3</sup>	4,2
5 cm <sup>3</sup> 0,1 mol CH <sub>3</sub> COOH und 5 cm <sup>3</sup> m/15 CH <sub>3</sub> COONa	90 cm <sup>3</sup>	4,2
10 cm <sup>3</sup> m/15 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	90 cm <sup>3</sup>	4,7
2,5 cm <sup>3</sup> 0,1 mol Citronensäure und 7,5 cm <sup>3</sup> m/15 Natriumcitrat	90 cm <sup>3</sup>	4,7
5,8 cm <sup>3</sup> 0,1 mol H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> und 4,2 cm <sup>3</sup> m/150 Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	90 cm <sup>3</sup>	7,4
4,8 cm <sup>3</sup> m/15 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 5,2 cm <sup>3</sup> m/15 K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	90 cm <sup>3</sup>	7,4
6,6 cm <sup>3</sup> 0,1 mol H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> und 2,4 cm <sup>3</sup> m/15 K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	90 cm <sup>3</sup>	7,4

fen, ob verschiedene Puffer bei cH-Gleichheit einen unterschiedlichen Einfluß auf die Deplasmolysezeiten ausüben. Die verschiedenen in Tabelle 9 angegebenen Pufferkombinationen wurden empirisch mit der Glaselektrode ermittelt. Zur Untersuchung kamen die drei pH-Stufen 4,2, 4,7 und 7,4.

Als Objekte dienten *Helodea canadensis* und *Rhoeo discolor*. Folgende Feststellungen konnten gemacht werden. Bei pH 4,2 trat eine Deplasmolyse nur im Phosphatpuffer ein, im Acetat- und Citratpuffer waren die Zellen

noch vor Eintritt der Deplasmolyse abgestorben, und zwar im Acetat- eher als im Citratpuffer. Gleiche Erfahrungen ließen sich auch für pH 4,7 machen.

Bessere Ergebnisse lieferten die Versuche bei pH 7,4. Die *Helodea*-Zellen plasmolysierten gleichmäßig, im Boraxpuffer war die Deplasmolyse nach 15 Minuten, in den Phosphatpuffern nach 17 Minuten eingetreten. Ein Unterschied von 2 Minuten ist aber zu gering, um daraus Beweise ableiten zu können. Interessantere Beobachtungen ließen sich während der Versuche mit dem weniger permeablen *Rhoeo discolor* bei pH 7,4 machen. Bereits nach einstündigem Einwirken des Plasmolytikums waren die Schnitte im Boraxpuffer bläulich gefärbt, eine Konvexplasmolyse trat etwa gleichzeitig mit beendeter Umfärbung ein. Die Schnitte in den phosphatgepufferten Harnstofflösungen zeigten zunächst Konkavplasmolyse, die erst nach 8 Stunden in eine Konvexplasmolyse überging. Nach 16 Stunden war die Plasmolyse in allen drei Ansätzen gleichmäßig zurückgegangen und nach 22 Stunden waren alle Schnitte deplasmolysiert. Aus diesem Ergebnis geht hervor, daß die Zusammensetzung der benutzten Puffergemische nicht zu vernachlässigen ist.

#### D. Besprechung der Ergebnisse

Bei der Auswertung der Ergebnisse müssen verschiedene Tatsachen Berücksichtigung finden. Es ließ sich immer wieder feststellen, daß Pflanzen auf gleichbleibende Versuchsbedingungen nicht immer gleichmäßig reagierten. Dieses wechselhafte Verhalten hat seinen Grund in verschiedenen Ursachen. Besonders bei Objekten, die ich über einen längeren Zeitraum zu beobachten hatte, traten verschiedenartige Ergebnisse zutage. In der Beschreibung der Versuche mit *Bryophyllum* habe ich schon darauf hingewiesen, daß die Aufnahmegeschwindigkeit für Harnstoff von der Jahreszeit sehr abhängig ist. Diese Tatsache, auf die bereits Fitting (1915) für andere Objekte hinweist, ließ sich ebenfalls in starkem Maße bei *Rhoeo discolor* und bei *Campanula rapunculoides* beobachten. *Rhoeo discolor* deplasmolysierte in Harnstofflösungen gleicher Konzentration im Februar nach ~ 5 Stunden, im Mai nach ~ 22 Stunden und im Juli nach ~ 8 Stunden. Meine Versuche an *Campanula* wurden im Mai/Juni an Freilandmaterial und im Februar an Gewächshauspflanzen mit gleicher Entwicklungsstufe durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die Schnitte zur Deplasmolyse im Februar eine zwei- bis dreimal so lange Zeit benötigten wie im Mai des Vorjahres. Da für die beiden Versuchsperioden Material gleicher Entwicklungsstufe verwendet wurde, können wir annehmen, daß nicht das Alter der Pflanzen, sondern entweder die jahreszeitlichen Schwankungen oder die ökologischen Anzuchtbedingungen für die auftretenden Unterschiede verantwortlich zu machen sind.

Selbstverständlich ist mit einer Änderung des osmotischen Wertes auch eine parallele Änderung der Deplasmolysezeit verbunden, wie es die Versuche an blühender *Campanula* deutlich zeigten. Man wird also nicht immer entscheiden können, ob die Jahreszeit oder das Alter der Pflanzen ihr ver-

schiedenes Verhalten bedingen, mitunter wird es so sein, daß beide Faktoren eine Wirkung ausüben.

Aber auch Witterung und Standort der Pflanzen wirkten sich auf die Aufnahmegeschwindigkeit für Harnstoff und Glycerin aus. Alle diese

Tab. 10. *Deplasmolysezeiten von Campanula rapunculoides für Harnstoff in den einzelnen Meßreihen in Sekunden und in der Zusammenfassung in Minuten, für Glycerin nur in Minuten angegeben. Die Meßreihen lassen deutlich die Variationsbreite der gefundenen Werte erkennen.*

Harnstoff 0,9 mol													
1952													
pH	5. 5.				6. 5.				7. 5.				
3,4	105	85	90	90	165	105	110	45	195	105	105	35	110
4,6	—	95	—	—	135	105	105	60	195	120	105	35	120
5,7	105	85	90	70	165	120	95	180	120	240	90	135	45
7,3	240	345	315	345	870	340	240	280	180	345	220	275	105
9,5	480	315	310	450	765	465	255	—	270	420	210	195	150
1953													
pH	7. 5.				14. 5.	28. 5.	3. 6.	17. 6.	19. 2.	20. 2.	27. 2.	10. 4.	1. 5.
3,4	50	105	70	130	95	60	—	195	230	190	280	255	2,4
4,6	40	110	—	140	100	120	75	223	215	190	250	255	2,5
5,7	70	135	105	150	105	135	105	238	225	230	330	260	3
7,3	180	315	240	420	300	240	505	620	300	720	490	720	7
9,5	360	315	315	490	545	285	635	1105	—	795	480	780	9
Glycerin 0,9 mol													
1953													
pH	20. 2.		23. 2.		25. 2.	26. 2.	27. 2.			10. 4.	1. 5.		min
3,0	33	37	27	63	173	35	37	25	—	30	40	100	54
3,4	60	—	23	—	62	35	56	30	—	17	70	55	44
4,7	15	30	30	60	62	42	35	25	45	30	70	45	41
5,7	13	24	—	35	70	46	47	27	45	15	45	70	39
6,1	33	30	74	64	86	61	47	42	90	17	90	40	56
6,6	34	—	80	100	131	108	70	35	75	30	90	55	73
7,3	34	12	64	52	101	81	60	30	75	30	145	—	62
9,5	—	—	—	—	—	—	40	20	60	—	90	—	52

Faktoren müssen berücksichtigt werden. Es war deshalb notwendig, die Versuche als Meßreihen über alle pH-Bereiche gleichzeitig anzusetzen. Eine Berechnung des mittleren Fehlers konnte aus demselben Grunde auch nicht erfolgen, denn die Parallelwerte der einzelnen Meßtage weichen mitunter weit voneinander ab. Die Tabelle 10 zeigt für *Campanula* diese Abwei-

chungen deutlich. Vergleicht man aber die Meßreihen als Ganzes miteinander, so tritt die Tendenz der cH-Abhängigkeit bei jedem Objekt klar hervor. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Geschwindigkeit der Stoffaufnahme und der cH des Außenmediums zu bestehen scheint. Diese Erscheinung können wir nicht allein auf eine Veränderung des Verteilungskoeffizienten (VK) bei wechselnder cH zurückführen (Drawert 1948). Die Stoffaufnahme wird von den verschiedensten Faktoren beeinflusst, so daß wir noch andere Gesichtspunkte zur Deutung der cH-Abhängigkeit heranziehen müssen.

Auffallend ist es auch, daß im mittleren pH-Bereich der Meßreihen Schwankungen immer dann auftreten, wenn längere Deplasmolysezeiten vorliegen. So finden sich bei den Harnstoffwerten für *Rhoeo* Unregelmäßigkeiten, bei den Glycerinwerten dagegen nicht. *Rhoeo* ist aber ein ausgesprochener Glycerintyp. Umgekehrt sind die Verhältnisse bei den extremen Harnstofftypen *Campanula* und *Lemna*.

Ferner ist auch zu bedenken, daß die Puffersubstanzen als Ionen diejenigen zusätzlichen Wirkungen ausüben können, die Prell (1953) den Ionen zuweist. In reinen, ungepufferten Harnstofflösungen deplasmolisieren die Zellen langsamer als in gepufferten Lösungen, wie an *Campanula* festgestellt werden konnte. Diese Beobachtungen stehen mit den Angaben von Prell (1953) im Einklang, daß mit einem Diosmotikum kombinierte Ionen eine zusätzliche Volumenzunahme des Protoplasten bedingen, so daß eine schnellere Deplasmolyse eintritt. Diese schnellere Deplasmolyse beruht aber nicht auf einer schnelleren Aufnahme des geprüften Stoffes. Die mit der plasmolytischen Methode erzielten Ergebnisse können danach unter Umständen kein Absolutmaß für die Aufnahmegeschwindigkeit von Harnstoff und Glycerin darstellen. Sie würden sich vielmehr aus Harnstoff- bzw. Glycerin- und aus Ionenwirkung zusammensetzen. Da es bisher noch nicht gelungen ist, die osmotische von der meta- und nichtosmotischen Stoffaufnahme zu trennen oder jede für sich einzeln zu bestimmen, ist es auch nicht möglich, in der Frage der Ionen und der Mitwirkung der cH eine endgültige Entscheidung zu fällen. Aus den oben dargelegten Gründen können wir aber annehmen, daß nicht nur die wechselnde cH der Grund für eine Änderung der Aufnahmegeschwindigkeit für Harnstoff und Glycerin ist, sondern daß die durch die Puffersubstanzen bedingte schwankende chemische Zusammensetzung des Diosmotikums und eine Aufnahme der Puffersubstanzen selbst nicht zu vernachlässigen sind.

Das Verhalten der einzelnen Objekte und die „verkehrte“ cH-Abhängigkeit bei *Campanula* zeigen deutlich, daß den Objekten selbst auch eine entscheidende Bedeutung bei der behandelten Stoffaufnahme zukommt. Ob dabei die Plasmagrenzflächen oder irgendwelche Speichervorgänge eine Rolle spielen, kann hier nicht erörtert werden.

Für die Veränderung der Aufnahmegeschwindigkeit bei wechselnder cH des Zellsaftes kann folgende Erklärung gegeben werden. Wie die Versuchsergebnisse an *Bryophyllum* zeigen, ergibt sich bei einer Erhöhung der cH des Zellsaftes gleichzeitig eine Verkürzung der Aufnahmezeit für Harnstoff und Glycerin. Die Erhöhung der Acidität des Zellsaftes ist auf die Zunahme

der organischen Säuren zurückzuführen. Aus Abb. 1 dieser Arbeit ist andererseits zu entnehmen, daß eine Erhöhung des Säuregehaltes in der Lipoidphase in den Modellversuchen auch eine sich dazu proportional verhaltende verstärkte Lösung des Harnstoffes in dieser Phase zur Folge hat. Nach Collander und Bärlund (1933) ist dieses bessere Lösungsvermögen bei allen von ihnen untersuchten Nichtelektrolyten vorhanden. Die Löslichkeit steht im Zusammenhang mit der chemischen Konstitution des Nichtelektrolyten. Daraus kann man für die lebende Zelle folgern, daß die organischen Säuren des Zellsaftes in ihrer Eigenschaft als Säuren wirken. In den Versuchen mit *Bryophyllum* wäre also anzunehmen, daß der Harnstoff sich mit sauren Zellsaftkomponenten in einer osmotisch wirksamen Form verbindet und so zu einer schnellen Deplasmolyse führt. Aber auch hier ist die cH des Zellsaftes nicht der einzige Faktor, der die Aufnahmegeschwindigkeit bedingt, wie aus einem Vergleich der untersuchten Objekte hervorgeht. Die cH-Unterschiede der Preßsäfte der einzelnen Pflanzen variieren in gewissen Grenzen, die Aufnahmegeschwindigkeiten zeigen aber wesentlich größere Unterschiede.

Von einer kausalen Klärung der Abhängigkeit der Deplasmolysegeschwindigkeit von der cH der Außenlösung und des Zellsaftes sind wir also noch weit entfernt, wir können zunächst nur die Tatsache feststellen, daß so eine Abhängigkeit besteht.

### E. Zusammenfassung

1. In Modellversuchen mit Olivenöl-Ölsäure und wässriger Harnstofflösung wurde ermittelt, daß die Verteilung des Harnstoffes zwischen wässriger Phase und Ölsäure-Ölphase dem Henry-Nernstschen Verteilungssatz folgt. Ferner ist der Verteilungskoeffizient (VK) des Harnstoffes dem Ölsäuregehalt der Ölphase direkt proportional. Der VK wird bei einer Änderung der cH der wässrigen Phase nicht wesentlich verschoben.

2. Die Aufnahme von Harnstoff und Glycerin durch die lebende Zelle wird unter den angegebenen Versuchsbedingungen nicht durch anaerobe Verhältnisse beeinflusst; dagegen wird die  $\text{KNO}_3$ -Aufnahme durch Sauerstoffmangel gehemmt.

3. Die Aufnahmegeschwindigkeit für Harnstoff und Glycerin ist von der cH des Außenmediums abhängig, wobei drei Gruppen von Objekten unterschieden werden können. Bei *Rhoeo discolor*, *Helodea canadensis*, *Lemna gibba* und *Bryophyllum daigremontianum* nimmt die Aufnahmegeschwindigkeit mit steigendem pH-Wert der Außenlösung zu, bei *Campanula rapunculoides* nimmt sie dagegen ab. Die Chlorophyceen *Oedogonium* weist eine Optimumkurve auf.

4. Die Aufnahmegeschwindigkeit wird außerdem von der cH des Zellsaftes beeinflusst, denn sie nimmt bei *Bryophyllum daigremontianum* mit fallender cH des Gewebepressaftes ab.

5. Es konnte wiederholt beobachtet werden, daß auch die Puffersubstanzen in die Zellen eindringen und dort schädigende oder zusätzliche osmotische oder ansmotische Wirkungen ausüben.



6. Aus den Beobachtungen geht hervor, daß es von großer Wichtigkeit ist, daß auch bei allen zellphysiologischen Untersuchungen die ökologischen Bedingungen, unter denen sich die Versuchspflanze befindet, berücksichtigt werden. Es wurde im Laufe der Untersuchungen wiederholt festgestellt, daß die Jahreszeit, der Standort, der Feuchtigkeitsgehalt des Bodens und die Witterung die Ergebnisse stark beeinflussen.

Herrn Professor Dr. H. Drawert danke ich für die Anregung der Arbeit.

# Literatur

- Bärlund, H., 1929: Permeabilitätsstudien an Epidermiszellen von *Rhoeo discolor*. Acta Bot. Fenn. 5, 6.
- Bogen, H. J., 1938: Untersuchungen zu den „spezifischen Permeabilitätsreihen“ Höflers. II. Harnstoff und Glycerin. Planta 28, 535.
- 1940: Untersuchungen über den Quellungeffekt permeierender Anektrolyte. I. Ionenwirkung auf die Permeabilität von *Rhoeo discolor*. Z. Bot. 36, 65.
- 1949: Referat über die Arbeit von H. Drawert (1948) in Ber. wiss. Biol. 66, 200.
- Bünning, E., 1936: Über die Farbstoff- und Nitrataufnahme bei *Aspergillus niger*. Flora 131, 87.
- Collander, R., und H. Bärlund, 1933: Permeabilitätsstudien an *Chara ceratophylla*. II. Die Permeabilität für Nichteletrolyte. Acta Bot. Fenn. 11, 2.
- und A. Holmström, 1937: Die Aufnahme von Sulfosäurefarbstoffen seitens pflanzlicher Zellen — ein Beispiel der adenoiden Tätigkeit der Protoplasten. Acta Soc. Fauna et Flora fenn. 60, 129.
- Drawert, H., 1938: Über die Aufnahme und Speicherung von Prune pure durch die pflanzliche Zelle. Planta 29, 179.
- 1940: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 154, 159.
- 1948a: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. IV. Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration des Zellsaftes und des Außenmediums auf die Harnstoffaufnahme. Planta 35, 579.
- 1948b: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. V. Zur Theorie der Aufnahme basischer Stoffe. Z. Naturforsch. 3b, 111.
- 1951: Beiträge zur Vitalfärbung pflanzlicher Zellen. Protoplasma 40, 85.
- 1955: Der pH-Wert des Zellsaftes. In W. Ruhland, Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. I, S. 627. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- und B. Endlich, 1956: Der Einfluß von Sauerstoff und Atmungsgiften auf die Aufnahme und Speicherung saurer und basischer Farbstoffe durch die lebende Pflanzenzelle. Protoplasma 46, 170.
- Fitting, H., 1915: Untersuchungen über die Aufnahme von Salzen in die lebende Zelle. Jb. wiss. Bot. 56, 1.
- Gustafson, F. G., 1925: Diurnal changes in the acidity of *Bryophyllum calycinum*. J. gen. Physiol. (Am.) 7, 719.
- Hinsberg-Lang, 1951: Medizinische Chemie für den klinischen und theoretischen Gebrauch. 2. Aufl. München-Berlin.
- Iljin, W. S., 1928: Die Durchlässigkeit des Protoplasmas, ihre quantitative Bestimmung und ihre Beeinflussung durch Salze und durch die Wasserstoffionenkonzentration. Protoplasma 3, 558.

- Keyssner, E., 1931: Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration in der Nährlösung auf die Reaktion in der Pflanze. *Planta* 12, 575.
- Krebs, J., 1932: Beiträge zur Kenntnis des Desmidiaceen-Protoplasten. III. Permeabilität für Nichtleiter. S.ber. Österr. Akad. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. 1, 161, 291.
- Marklund, G., 1936: Vergleichende Permeabilitätsstudien an pflanzlichen Protoplasten. *Acta Bot. Fenn.* 18, 1.
- Moder, A., 1932: Beiträge zur protoplasmatischen Anatomie des *Helodea*-Blattes. *Protoplasma* 16, 1.
- Pirschle, K., 1929: Nitrate und Ammonsalze als Stickstoffquelle für höhere Pflanzen bei konstanter Wasserstoffionenkonzentration. *Planta* 9, 84.
- Pirson, A., und F. Seidel, 1950: Zell- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* L. unter besonderer Berücksichtigung von Kalium- und Kalziummangel. *Planta* 38, 431.
- Prell, H., 1953: Untersuchungen über die Aufnahme von Anelektrolyten in Zellen di- und polyploider Pflanzen. *Planta* 41, 480.
- Rottenburg, W., 1944: Die Plasmapermeabilität für Harnstoff und Glycerin in ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration. *Flora* 137, 230.
- Strugger, S., 1935: Beiträge zur Gewebephysiologie der Wurzel. Zur Analyse und Methodik der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. *Protoplasma* 24, 108.
- 1936: Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. *Protoplasma* 26, 56.
- Virtanen, A. I., 1952: Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration in der Nährlösung auf die Reaktion in der Pflanze. *Planta* 15, 645.
- Wolf, J., 1932: Beitrag zur Kenntnis des Säurestoffwechsels succulenter Crassulaceen. *Planta* 15, 372.

# Über die Regeneration bei den Cladophoraceen

Von

Gustav Schoser

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen

Mit 23 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. Oktober 1955)

## 1. Einleitung

Cladophoraceen sind schon wiederholt für das Studium von Regenerationsvorgängen benutzt worden. M i e h e (1905) hat als erster die Regeneration von Meerescladophoren nach plasmolytischer und mechanischer Isolation beschrieben. C z a j a (1930) ist die Regeneration bei der Süßwasseralge *Cladophora glomerata* gelungen. Auch in cytologischer Hinsicht sind die Cladophoraceen öfters behandelt worden (Carter 1919, Schussnig 1925, List 1950, Peterschilka 1924 und Geitler 1956).

Trotz dieser zahlreichen Arbeiten ist die Regeneration bei *Cladophora* im Hinblick auf das zellphysiologische Geschehen noch nicht genauer untersucht worden.

## 2. Material und Methodik

### a) Algenmaterial

Zu den Versuchen sind verschiedene Arten verwendet worden. In der Wachstumsfähigkeit zeigen die Cladophoraceen eine große Variationsbreite, da bei einigen Arten alle Zellen teilungsfähig sein können (*Rhizoclonium*), andere meist Spitzenwachstum neben interkalarem aufweisen (*Cladophora*), wieder andere ausschließlich Spitzenwachstum (*Pitophora*).

Das Material wurde jeweils demselben Standort entnommen, gründlich ausgewaschen und hernach in große Kulturgefäße mit Nährlösung gebracht. Folgende Arten wurden verwendet:

1. *Cladophora glomerata* (L.) Kuetz. ampl. Brand von einem Brunnenausfluß in Tübingen-Lustnau.
2. *Cladophora fracta* var. *normalis* Rabenhorst aus einem Altwasserarm des Rheins bei Speyer.
3. *Cladophora fracta* var. *lacustris* (Kuetz.) Brand aus dem Stadtbrunnen von Trochtelfingen/Hohenzollern.

4. *Cladophora crispata* (Roth.) Kuetz. ampl. Brand im Zellaquarium des Botanischen Gartens Tübingen.

5. *Cladophora fracta* var. *ribularis* Brand im Alpinumteich des Tübinger Botanischen Gartens.

6. *Cladophora fracta* Kuetz. ampl. Brand aus dem Starnberger See.

7. *Rhizoclonium hieroglyphicum* (Agardh) Kuetz. Schloßbach bei Zirl, Tirol, in der Sill bei Gries am Brenner und in einem Brunnenauslauf in Tübingen-Lustnau.

8. *Pitophora oedogonia* (Mont.) Wittrock aus dem Warmwasserbecken des Botanischen Gartens Tübingen.

### b) Kulturbedingungen

Zur Gewinnung optimaler Bedingungen waren umfangreiche Versuche notwendig. Folgende Anordnung hat sich bewährt: Die gut gereinigten Algen wurden in 1-l-Kulturgefäße (viereckige Glasküvetten) mit Nährlösung gebracht. Diese Gefäße standen in einer 20 cm hohen Zinkwanne, die ständig mit Leitungswasser gespült wurde. Damit ließ sich eine ziemlich konstante Temperatur von 15° C ( $\pm 1^\circ$ ) erreichen. Zur Beleuchtung dienten zwei über die Zinkwanne gehängte Leuchtstoffröhren vom Typ HNW 120, 25 Watt (Osram), die in 30 cm Abstand von der Bodenfläche 800 Lux Lichtintensität liefern. Diese Intensität und die spektrale Energieverteilung der Leuchtstoffröhren erweist sich als durchaus geeignet für die Kultur der Cladophoraceen bei 12stündiger Belichtungsdauer.

Nach Versuchsreihen mit verschiedensten Nährlösungen hat sich, von den Versuchen von Uspenskij-Uspenskaja (1925) und Czaja (1950) ausgehend, eine eigene Lösung gut bewährt, die auf 1 l dest. Wassers enthielt:

KNO <sub>3</sub> . . . . .	50 mg
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	25 "
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	10 "
MgSO <sub>4</sub> . . . . .	10 "
CaSO <sub>4</sub> . . . . .	20 "
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . . . . .	105 "
Fe-Zitrat + Zitronensäure je	7,5 "

Dazu wurde je Liter 1 ml „Hoagland A“ (ohne Sn, Co, Cu, Ni) als Spurenelementlösung gegeben.

Die Nährlösung hielt ihren pH-Wert über ein bis zwei Monate; die Pufferung mit Karbonat sagte den Algen gut zu. Der pH-Wert ist 7.6. Das Eisen bleibt als Zitrat lange in Lösung. In den Stammkulturen wird die Nährlösung alle 4 Wochen gewechselt, in den Versuchsreihen bleibt die Nährlösung für die Dauer des Versuchs.

### c) Präparation

Zum Studium der Regeneration einzelner isolierter Zellen wurden die Algenfäden mit Hilfe eines Präpariermikroskops (Leitz 30fach) und Lanzetteln bzw. einer Pinzettenschere zerteilt. Die Zellstümpfe der zerstörten Nachbarzellen wurden von den Resten des Zellinhalts freigemacht, da diese Zellbruchstücke den Ablauf der Regeneration beeinträchtigen können. Es wurden jeweils etwa 25 isolierte Zellen in ein Reagenzglas mit 10 ml Nährlösung gebracht und mit einer Stanniolkappe gegen Verschmutzung abgedeckt. Hierauf erhielten die Algen die vorher beschriebenen Kulturbedingungen. Die regenerierenden Zellen wurden je nach den Versuchsbedingungen aus den Reagenzgläsern entnommen.

## d) Fixierung

Die Zellregenerate wurden in kleinen Filterpapiertüten von der Nährlösung getrennt, fixiert, ausgewaschen und auf einen Objektträger übertragen. Folgendes Fixierungsgemisch gab die einzelnen Zellbestandteile gut wieder und ermöglichte ein rasches Verarbeiten des Versuchsmaterials:

Chromsäure . . . . .	300 mg
Pikrinsäure . . . . .	100 mg
3% $K_2Cr_2O_7$ -Lösung in Wasser . . . . .	49 ml
Propionsäure . . . . .	1 ml
Zinkchlorid . . . . .	1000 mg
dest. Wasser . . . . .	50 ml

Fixiert wurde 30 Min. bis 2 Std. Hernach wurden die Objekte in Leitungswasser gewaschen.

## e) Färbung

Zur differenzierten Darstellung von Zellkern, Pyrenoiden, Chromatophoren und Plasma habe ich Eisenhämatoxylin als Kernfarbstoff verwendet (schwarz), die Pyrenoide habe ich mit Azophloxin (rot) tingiert, die Chromatophoren mit Alizarin-viridin (grün) und das Plasma (gelb) mit Naphtholgelb S. Für die meisten Untersuchungen ist die Hämatoxylinfärbung ausreichend, da sich das Plasma damit anfärben läßt (nähere Angaben über Farblösungen und Färbevorgang s. Schoser, Diss. Tübingen 1955).

## 3. Untersuchungen an lebenden und fixierten Regeneraten

## a) Verlauf der Regeneration

Miehe (1905, an Meerescladophoren) und Czaja (1930, an *Cladophora glomerata*) haben übereinstimmend festgestellt, daß das Regenerationswachstum am basalen Pol der Zelle einsetzt.

Die Beobachtung am lebenden Objekt ergibt bei *Cladophora glomerata* zunächst keinen Unterschied zwischen dem basalen und apikalen Teil der Zelle. Nach der Isolierung jedoch wölben sich die vom mechanischen Druck befreiten Querwände nach außen. In den folgenden zwei Tagen stülpt sich der Basalteil der Zelle in Richtung des alten Fadens immer mehr vor. Dann beobachtet man eine starke Anhäufung des Zellinhalts am basalen Pol, während der übrige untere Teil der Zelle durchsichtiger wird. Dies äußert sich besonders darin, daß der dichte „netzförmige Chromatophor“ stärker aufgelockert wird, ja sich sogar in kleine runde Scheibchen auflösen scheint, die nur durch Plasmabrücken verbunden sind. Diese Chromatophorenscheibchen häufen sich dann meist um die Pyrenoide.

Die Zellkerne können in vivo nicht beobachtet werden, da sie sich im Zellinnern befinden und allermeist durch Pyrenoide und Chromatophoren verdeckt bleiben. Nach Ablauf von etwa 8–14 Tagen hat sich die Rhizoidzelle, die inhaltsärmer ist als die Ausgangszelle, abgeteilt. Das Apikalwachstum läuft so ab, wie es von der Seitenzweighbildung her bekannt ist. Der apikale Sproß durchbricht also niemals die apikale Querwand, sondern der neue Trieb wächst ohne Ausnahme aus dem obersten Teil der Längswand hervor an der Stelle, an der auch die Schwärmer nach ihrer Entwicklung die Zelle verlassen. Das apikale Wachstum verläuft sehr rasch, die

Pflanze bildet bald einen normalen Thallus. Czaja vermutet, daß nur die zylindrische Längswand wachstumsfähig ist. Man kann außerdem beobachten, daß der obere Teil der Längswand eine größere Dehnbarkeit besitzt, was sich im Herbst oder bei ungünstigen Lebensbedingungen bei der Anlage der Dauerzellen äußert, die oben sehr stark anschwellen können, während



Abb. 1. *Cladophora fracta rioularis* ( $65 \times 12$ ). 4 Tage altes Regenerat. Der basale Pol während der Regeneration. Es ist eine deutliche Kern- und Plasmaanhäufung zu beobachten.

sie am basalen Zellteil die ursprüngliche Dicke beibehalten, bis dann nach einiger Zeit die Zelle sich mehr abrundet und mit einer dickeren Membran umgibt. — Dies deutet vielleicht darauf hin, daß in der oberen Zellwand das Mizellargefüge der Fibrillen weniger dicht ist bzw. mehr aus Hemizellulose und Pektinen besteht.

Bei den untersuchten Formen von *Cladophora fracta* finden sich im wesentlichen die gleichen Phänomene wie bei *Cl. glomerata*, *Cl. fracta* spec. regeneriert in 6 Tagen, *Cl. fracta* var. *lacustris* in 8 Tagen, während *Cl. fracta* var. *normalis*, *Cl. fracta* var. *crispata* und *Cl. fracta* var. *rioularis* in 8–10 Tagen eine Rhizoidzelle abgetrennt haben. Bei diesen Arten tritt besonders die inhaltsärmere Basalzelle in Erscheinung. Gelegentlich wird bei diesen Arten die Rhizoidzelle als Haftorgan mit mehreren Fortsätzen ausgebildet. Jede Rhizoidzelle zeigt in ihrem unteren Teil eine starke Anhäufung des Zellinhaltes, die wachsende Spitze selbst ist frei von Chloroplasten.

Bei der tropischen Grünalge *Pitophora* wurde die Regeneration von vegetativen Zellen und Akineten untersucht. Im Gegensatz zu den bisher besprochenen Arten findet hier sehr selten eine Rhizoidbildung statt, bei den Akineten ist sie überhaupt nicht beobachtet worden.

Findet eine basale Regeneration statt, so wächst das Rhizoid in der gleichen Dicke aus wie die isolierte Zelle selbst, ohne eine Form von Haftorgan zu bilden. Der Zellinhalt erscheint in allen Teilen gleich dicht, da alle Zellen eine große Anzahl von Pyrenoiden besitzen, die im Gegensatz zu denen der Cladophoren sich schon in der äußersten apikalen Region vorfinden. Die Regenerationszeit (Bildung einer neuen Zelle) dauert bei dieser Alge 14 Tage und mehr.

Die ruhenden Akineten von *Pitophora* sind tief dunkelgrün. Setzt das Wachstum ein, dann werden sie hellgrün, und an einer Zellseite wächst der neue Faden aus. In 10 Tagen ist die erste Querwand gebildet. Aber sicher sind für diese

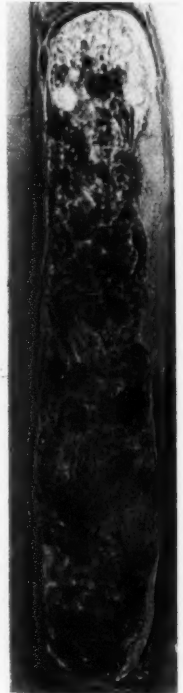


Abb. 2. *Rhizoclonium hieroglyphicum* ( $65 \times 12$ ). 1 Tag nach der Isolierung.



Alge die Temperaturbedingungen nicht optimal, da das Optimum höher liegen dürfte.

*Rhizoclonium hieroglyphicum* regeneriert sehr leicht. Schon am 2. Tag nach der Isolierung kann man am basalen Zellpol eine Akkumulation des Zellinhaltes beobachten. Nach weiteren 2–3 Tagen ist die Zelle in Richtung des alten Fadens in der ursprünglichen Dicke ausgewachsen. Die Chromatophoren werden bei dem raschen Wachstum stark zerklüftet, und nach 4–6 Tagen gliedert sich eine inhaltsärmere Basalzelle ab. Danach setzt auch das apikale Wachstum ein, dabei ist besonders zu bemerken, daß der neue Sproß wie ein Seitenzweig angelegt wird, obwohl bei normalem Wuchs die vegetativen Zweige fast vollkommen fehlen oder höchstens ein- bis wenigzellig sind. Dies ist um so erstaunlicher, als *Rhizoclonium* neben dem Spitzenwachstum ein ausgesprochen interkalares Wachstum aufweist.

#### b) Das Verhalten der Kerne

Zur mikroskopischen Untersuchung des Verhaltens der einzelnen Zellbestandteile während der Regeneration wurden Präparate mit Vierfärbung angefertigt, und zwar mit allen eingangs genannten Arten. Außerdem wurden Zellen von *Cl. crispata*, *Cl. fr. rivularis* und *Rhizoclonium* in den ersten Tagen der Regeneration alle 2 Std. fixiert und mit Hämatoxylinlösung gefärbt.

Im Augenblick der Zellisolierung liegen die Kerne meist in spiraliger Anordnung im Zellumen innerseits der Chromatophoren. Bei *Rhizoclonium* sind die Zellkerne in gleichen Abständen in einer Reihe angeordnet, ebenfalls bei dünnen Fäden von *Cl. fracta* der verschiedenen Arten, bei *Pitophora* liegen die Zellkerne regellos in der Zelle. Bei vielkernigen Zellen läßt sich jedoch eine deutliche Kernakkumulation im Apikalteil feststellen.

Löst man aber durch Isolierung der Zellen (bei Beginn der Dunkelperiode) die Regeneration aus, so ändern sich diese Verhältnisse grundlegend. Zunächst gibt der ganze Protoplast der isolierten Zelle dem fehlenden Wanddruck nach, er rundet sich ab. Ferner hören die sonst synchron ablaufenden Mitosen in der Zelle fast schlagartig auf; es muß eine tiefgreifende Veränderung vor sich gehen. Die Mitosen im normalen Faden setzen gewöhnlich am apikalen Ende ein, was durch das dichtere Plasma verständlich wird (vgl. Bünning 1953). 2 Std. nach der Isolierung findet man noch vereinzelt Mitosen am Apikalende, basal sind sie rasch zum Abklingen gekommen, und es scheint sich zunächst an den Zellkernen nichts zu ändern. Schon 4 bzw. 6 Std. nach der Lostrennung der Zellen aus dem Faden vertieft sich die Kernfärbung und eine stärkere Plasmafärbung tritt in Erscheinung. Außerdem kann man an Zellen mit weniger als acht Zellkernen eine basale Verlagerung der Nuclei beobachten. Nach 10 Std. ist bei *Cl. crispata* vereinzelt die Ausstülpung des Protoplasten an der Zellbasis zu erkennen, damit gehen basale Kernteilungen einher. Eine deutlich intensivere Plasmafärbung beobachtet man 12 Std. nach der Isolierung. In der anschließenden 12stündigen Lichtperiode verändern sich diese Befunde unwesentlich. Nur vereinzelt beobachtet man Mitosen an der Zellbasis, ein Zeichen dafür, daß (vgl. Geitler 1936) wir hier keine ausgesprochene Mitoserhythmik mehr haben. Das Plasma zeigt in dieser Zeitspanne keine erkennbare Veränderung. — Nach 24 Std. ist eine fortschreitende Kern-

häufung an der Zellbasis zu beobachten, was durch die basal ablaufenden Mitosen bedingt sein mag. Nach 36 Std. sind die ersten Ansätze der Rhizoide ausgebildet, die etwa ein Zehntel der alten Zelllänge betragen. Isoliert man aber zwei Zellen, so ist apikal und basal der Regenerationsvorgang zu beobachten. Die Zelle scheint also im allgemeinen gleichzeitig nur an einem Zellpol zur Regeneration befähigt zu sein. Hat eine Zelle im Fadenverband begonnen, einen Seitenzweig anzulegen, so regeneriert sie an beiden Zellpolen, wobei aber nachfolgend die Basis bevorzugt wird.

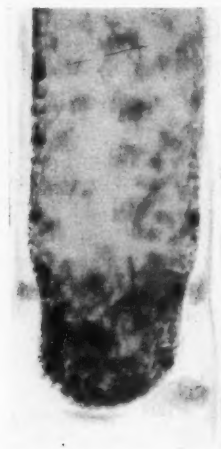


Abb. 5. *Cladophora crispata* (40 × 6). Ein Zellregenerat 28 Std. nach der Isolierung. Die Ausbildung des basalen Pols mit dichtem Plasma und vielen Kernen wird sichtbar (mit Hämatoxylinlösung gefärbt).

Konform mit diesen Veränderungen geht die Vergrößerung des Nucleolusvolumens, weniger ausgeprägt ist zunächst das Kernwachstum selbst. Der Nucleolus seinerseits orientiert sich im Kern mehr der Zellbasis zu. Als weiteres Symptom fällt die starke Färbbarkeit des ganzen Kerns immer wieder ins Auge. Nach der Teilung entstehen gleich große, gleichgestaltete Kerne, die aber im Gegensatz zu den Ruhekernen größere Nucleolen aufweisen. In einigem (je nach der Art verschiedenem) Abstand vom apikalen Pol vergrößert sich neben dem Nucleolusdurchmesser auch der des Kerns um rund 20% gegenüber dem des Ruhekernes. Diese Kerne haben meist die Gestalt eines Ellipsoides, während die des apikalen Pols fast ausschließlich kugelig sind. Unmittelbar vor der Teilung wächst natürlich auch das Volumen der Zellkerne am apikalen Pol stark an und bleibt nach der Mitose längere Zeit im Verhältnis zum Ruhekern reduziert.

Wenn das Wachstum an der Apikalseite der Zelle einsetzt, liegen die Verhältnisse hier zunächst ähnlich wie an der Basis. Wiederum ist erhöhte Färbbarkeit zu verzeichnen. Die Mitosen sind auch hier nicht mehr gleichzeitig, trotzdem unterscheidet sich die apikale Regeneration kaum vom normalen Wachstum.

### c) Das Kern-Nucleolus-Volumen-Verhältnis

Dem Nucleoluswachstum folgt das Kernwachstum nach. Alle Beobachtungen und Messungen deuten darauf hin, daß diese Beziehung im Regenerationsverlauf nicht konstant bleibt. Immer dann, wenn wir starkes Plasmawachstum antreffen, vergrößert sich das Kernkörperchen beträchtlich. Somit scheinen die Nucleoli auch hier ein Kriterium für das Plasmawachstum darzustellen, was besonders deutlich wird an Stellen intensiver Plasmabildung (vgl. Caspersson 1950, Bünning 1951, Zepf 1952, Bünning und Biegert 1953). Es zeigt sich weiter, daß das Kernvolumen am apikalen Pol weniger vergrößert wird, als wir es an der Apikalseite vorfinden. Andererseits zeigen die Messungen ein Ansteigen des Kern-



Tabelle 1. Das Verhältnis der Volumenänderung von Kern und N  
25 Einzelmessungen; sie geben das Volumen in  $\mu^3$  an, und zwar

	Kerne in unmittel- barer Nähe des Apikalpols	Kerne im oberen Zellteil	Kerne in mitte (m von Int (Ruhe abwei
1. <i>Cladophora</i> <i>glomerata</i> . . .	113,0/48,0	70,0/18,5	65,
2. <i>Cl. fracta</i> var. <i>normalis</i> . . .	74,0/48,6	74,0/21,6	65,
3. <i>Cl. fr.</i> var. <i>lacustris</i> . . .	105,0/42,0	48,0/31,0	88,
4. <i>Cl. crispata</i> . .	151,0/42,0	125,0/36,0	113,
5. <i>Cl. fr.</i> var. <i>rivularis</i> . . .	87,0/42,5	92,5/36,0	97,
6. <i>Cl. fr. spec.</i> . .	92,5/48,5	78,0/36,0	83,
7. <i>Pitophora</i> . . .	238,0/64,0	142,0/41,0	196,
8. <i>Pitophora</i> - Akineten . . .	126,0/73,0	126,0/41,0	172,
9. <i>Rhizoclonium</i> <i>hieroglyphicum</i> .	97,0/48,0	78,0/26,3	83,

und Nucleolus während der Regeneration (die Zahlen sind Mittelwerte aus  
zwar jeweils die erste Zahl für den Kern, die zweite für den Nucleolus).

Kerne in der Zell- te (meist kaum on Interphase- Ruhe-) Kern abweichend)	Kerne im unteren Teil des Rhizoids	Kerne in der Nähe des Basalpol	Zunahme des Volumens gegen den Ruhekern an der Basis	
			Kern	Nucleolus
65,5/18,5	113,0/41,0	92,0/49,0	1,7mal	2,6mal
65,6/21,4	131,0/56,0	66,0/48,6	1,5mal	2,7mal
88,0/21,5	151,0/64,0	120,0/64,0	1,7mal	3,0mal
113,0/25,6	138,0/64,0	113,0/73,0	1,4mal	2,9mal
97,0/21,4	129,0/64,0	83,0/64,0	1,5mal	3,0mal
83,0/26,3	129,0/73,0	69,5/56,0	1,9mal	2,9mal
196,0/21,7	210,0/73,0	108,0/73,0	2,0mal	3,5mal
172,0/18,5	132,0/21,7	108,0/18,5	1,6mal	3,9mal
83,0/18,5	144,0/48,0	88,0/48,0	1,8mal	2,7mal

Über die Regeneration bei den Cladophoraceen

volumens in einiger Entfernung vom apikalen Pol in der Zone, in der sich die lebhafteste Ergrünung der Chromatophoren nachweisen läßt, das Nucleolusvolumen sich aber kaum ändert.

In Übereinstimmung mit den Angaben Geitlers (1936) wurde meist ein Nucleolus festgestellt. Zur Messung wurden deshalb Kerne mit einem Nucleolus ausgesucht. Tab. 1 gibt einen Überblick über die Verhältnisse von Kern und Kernkörperchen. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus 25 Einzelmessungen dar, die sich über den Zeitraum der Regeneration der einzelnen Arten erstrecken.

Daraus ergibt sich, daß der Zellkern mit dem Kernkörperchen eine enge Korrelation mit dem Plasma hat. Er kommt in der Zelle meist da zu liegen, wo das Zellplasma die größte Dichte hat bzw. er wandert dorthin (vgl. Heitz 1925, Bünning u. Biegert 1955). Bei den untersuchten Cladophoraceen ist die Kernteilung (Bünning 1955, Zimmermann 1925) nach der Zellisolierung zunächst gehemmt (20–30 Std., je nach Art verschieden). Hierauf setzt eine rasche Kernteilungsfolge an der Zellbasis ein. Die Kerne werden stärker färbbar, die Nucleolen vergrößern sich, und nachfolgend ist in dieser Zellregion eine Kernhäufung zu beobachten. Heitz (1925) hält eine mechanische Verlagerung sämtlicher Plasmateile für wahrscheinlich, der jedoch eine Plasmavermehrung und Kernvolumenvergrößerung vorausgeht, was auch mit den gefundenen Ergebnissen in Einklang steht. Eine eigentliche Kernwanderung ist indes hier nur schwer festzustellen. Wohl ist die Zellkernvergrößerung, die stärkere Färbbarkeit und eine zunehmende Teilungsfrequenz wahrzunehmen, wahrscheinlich wird ebenfalls die Zunahme des Nucleolusvolumens vom dichteren Plasma beeinflusst oder gar gesteuert, doch lassen sich hieraus noch keine endgültigen Schlüsse ziehen, wie die gegenseitige Beeinflussung von Plasma und Kern bzw. Nucleolus vor sich geht. Andererseits ist es eine bekannte Tatsache, daß das Nucleoluswachstum eine Folge vermehrter Eiweißsynthese verdeutlicht. Wächst der Zellkern, so geht das Plasmawachstum voraus (Abele 1951). Die polare Akkumulation der Zellkerne am Rhizoidpol spricht für ein besonders intensives Wachstum an diesem Pol. Dies ist um so einleuchtender, als das Kernvolumen eine bestimmte Größe nicht überschreitet, dafür aber das Nucleolusvolumen in diesem Bereich relativ stark ansteigt (vgl. Tab. 1 über Kern- und Nucleolusverhältnisse).

#### d) Das Plasma

Durch die Isolierung scheint eine Neubelebung zytoplasmatischen Wachstums angeregt zu werden. Anscheinend ist die Vermehrung und Verlagerung der Plasmamasse das Primäre (vgl. Heitz 1925). Sie äußert sich bei den Cladophoren auch darin, daß sich beim wachsenden Rhizoid keine Vakuole findet, die sonst so bezeichnend für die Cladophorazelle ist. Die Untersuchungen zeigen weiter eine Beziehung zwischen Plasmawachstum und Nucleolusgröße, wie es schon seit längerem bekannt ist (Caspersson 1950, Bünning 1951, Zepf 1952, Bünning u. Biegert 1955). An *Acetabularia* hat Stich (1951) die Beziehung zwischen Plasmamasse und



Kerngröße herausgearbeitet. Damit bestätigen sich die Befunde von Heitz (1925), der seine Ergebnisse an Leber- und Laubmoosen gewonnen hat.

Die zweistündigen Fixierungen der Regenerate ergeben außerdem, daß eine Plasmaanhäufung oder Neubildung schon in dem Augenblick am Basalpol erfolgt, wenn die basale Abkuglung der Zelle eintritt. Nach 6 Std. ist dort die Färbung intensiver als in anderen Zellteilen. Dies kann aber nicht nur von einer mechanischen Plasmaverlagerung herrühren, da dieser Vorgang mit verstärkter Kernfärbung einhergeht. Nach 24 Std. ist eine größere Dichte des basalen Plasmas in allen Zellen, gleich welcher physiologischen Konstitution sie sind, festzustellen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Zimmermann (1923) an *Sphacelaria* kann bei den Cladophoraceen zunächst von keiner innerstrukturellen Veränderung der Zelle gesprochen werden.

Da die Nucleolengrößen ein annäherndes Maß für das Plasmawachstum darstellen, wurden sie zum Vergleich gemessen. Hierbei zeigt sich besonders deutlich die bevorzugte Lage des Zellkerns mit den vergrößerten Nucleolen an den Stellen intensivsten Plasmawachstums.

Um einen weiteren Einblick in die plasmatischen Verhältnisse zu gewinnen, habe ich Plasmolyseversuche durchgeführt. Als Plasmolytikum diente hauptsächlich 0,6 molare Rohrzuckerlösung. Schon vor einer in vivo sichtbaren Plasmaanhäufung tritt die polare Struktur der Protoplasten zutage. In normalen Fadenzellen ist an der Zellbasis ein positiver Plasmolyseort festzustellen; isolierte Zellen zeigen im Gegensatz dazu bereits einen Tag nach der Abtrennung ein festeres Haften der Plasmagrenzschichten an der Zellmembran des basalen Endes.

In gut ausgebildeten Rhizoidzellen läßt sich nach 5–10 Min. am apikalen Pol ein negativer Plasmolyseort beobachten. Im Rhizoid zerfällt der Protoplast in mehrere Teile, der größte befindet sich immer an der Spitze. Die einzelnen Teile sind durch Hechtsche Fäden verbunden. Dies verdeutlicht die verschiedenartige Beschaffenheit der Plasmagrenzschicht vor und während der Regeneration. Auch Zepf (1952), Bünning und Biegert (1953) fanden an Orten aktiver Plasmataktivität negative Plasmolyseorte.

Schon Heitz (1925) hat am Lebermoos *Lophocolea* nach Abtrennung einzelner Zellen zunächst ein Plasmawachstum feststellen können, er hat dies ebenfalls an den Phanerogamen *Peperomia*, *Calandrinia* und *Bryophyllum* gefunden. Bei den untersuchten Cladophoraceen wird zunächst die Embryonalität nur an einem Zellpol, dem basalen Ende, deutlich. An der

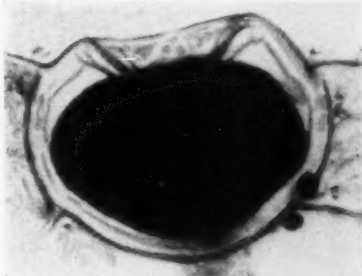


Abb. 4. *Pitophora oedogonia* ( $12 \times 40$ ). Die Plasmolyse einer Akinete. Der Zellinhalt der regenerationsbereiten Zelle liegt der Zellwand dicht an, dadurch ist die Zellwand bei der Plasmolyse eingedrückt. An dieser Stelle wächst der neue Faden aus.

Stelle stärkeren Plasmawachstums haftet das Plasma stärker an der Zellwand. Diese Ergebnisse für *Cladophora* entsprechen somit der bekannten Tatsache, daß der Zellkörper in den wachsenden Zellen fester der Zellwand anliegt als in ruhenden.

#### e) Der „Chromatophor“ und die Pyrenoide

Die Chromatophoren der *Cladophora*-Zelle sind bisher allgemein seit Strasburger als wandständiger, durchlöcherter, einheitlicher Zylindermantel beschrieben worden. Demgegenüber hat Moser (1942) darauf hingewiesen, daß er sich deutlich in Einzelchloroplasten gliedert. Das tritt ebenfalls bei der Schwärmbildung (List 1950) in Erscheinung, bei der sich die Chloroplasten rund um den Kern lagern, ehe sich die Zoospore mit einer Membran umgibt. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen das gleiche Bild. Zwar ist in der normal gewachsenen Zelle der Chromatophor als einheitliches Gebilde anzusprechen. Bei eingehender Betrachtung jedoch — besonders bei der Regeneration — erkennt man den „Chromatophor“ als einzelne Chloroplastenscheibchen oder -ellipsoide, die in einem dichteren, zäheren Plasma eingebettet liegen. Die Pyrenoide sind Gruppen von Chloroplasten außen aufgelagert. Wenn das Regenerationswachstum beginnt, wachsen die Chloroplasten zunächst mit dem sie umgebenden Plasma, ohne sich jedoch selbst zu vermehren. Dadurch wird der Chloroplastenverband lockerer, die einzelnen Chloroplasten sind deutlich sichtbar. Die Rhizoidzelle zeigt ungleiche, hellere Chloroplastenfärbung als die normale. Wahrscheinlich rührt es davon her, daß die Zelle durchscheinender ist und die Chloroplasten nicht so dicht gepackt sind. In einem gewissen Abstand vom Basalpol ist eine



Abb. 5. *Cladophora fraxa ripularis* (12×40).

Die „Chloroplastenscheibchen“ in lockerem Verband in einer regenerierenden Zelle.

dichtere Chloroplastenlagerung zu beobachten. Hier ist gelegentlich die Durchschnürung von Chloroplasten und Pyrenoiden anzutreffen. Diese Häufung steht hier wohl in unmittelbarem Zusammenhang mit der Aktivität des Plasmawachstums (vgl. Bü n n i n g 1953, He i t z 1925). Beim apikalen Wachstum sind diese Verhältnisse nicht so ausgeprägt.

In der äußersten Spitze des apikalen Pols sind die Pyrenoide fester mit den Chloroplasten verbunden, die Pyrenoide zeigen stets eine homogene Stärkehülle, die Vermehrung erfolgt durch Zweiteilung. Dies ist auch beim normalen Wachstum der Fall. Bei der Regeneration bleibt aber der Stärkehof meist kleiner als in der ruhenden Zelle und besteht aus zwei Hälften, jedoch fehlt er nie. Dies wurde übereinstimmend bei allen untersuchten Arten festgestellt.

Im Zuge der Regeneration wird der „Chromatophor“ zu kleinen Platten zurückgebildet, die nach Oltmanns (1923) wohl als primär anzusprechen sind; auch das stimmt mit Beobachtungen von Heitz (1925) und von Zepf (1952) überein. Es ist eindeutig festgestellt worden, daß es sich bei jeder der untersuchten Arten um keine einheitlichen Chromatophoren handeln kann, sondern um zahlreiche einzelne. Diese liegen je nach dem physiologischen Zustand dicht gepackt in einer homogenen Plasmaschicht, oder sie sind mehr oder weniger auseinandergezogen und als einzelne Chloroplastenscheibchen zu erkennen (vgl. Moser 1942). Dies zeigt sich besonders auffällig im Rhizoid. Bei der Regeneration lockern sich die Chloroplasten auf, sie kommen dem schnelleren Plasmawachstum nicht nach. Die Rhizoidspitze bleibt daher meist chloroplastenfrei. In einiger Entfernung davon ist aber eine Region zu erkennen, in der die Chloroplasten viel dichter liegen als in der übrigen Zelle und eine intensivere Ergrünung zeigen (vgl. Bünning 1953). Ohne Zweifel hängt das mit der plasmatischen Struktur zusammen. Erst nach erfolgter Zellteilung zeigen die Chloroplasten größeres Wachstum, wenn die Kern-Plasma-Relation wieder im Gleichgewicht ist. Ähnliches haben Küster (1952) bei *Chaetomorpha*, Heitz (1925) bei Lebermoosen, Zepf (1952) bei *Sphagnum* und Bünning und Biegert (1953) bei *Allium* gefunden.

Die Pyrenoide sind nicht aktiv in das protoplasmatische Wachstum einbezogen. Ihre Vermehrung erfolgt auch bei der Regeneration durch eine einfache Zweiteilung, sie scheinen eng mit den Chloroplasten verbunden zu sein. Selten sind sie schon in den äußersten Wachstumsspitzen anzutreffen, eine Ausnahme bildet hier nur *Pitophora*.



Abb. 6. *Cladophora fracta rivularis* (12×40). Die Chloroplastenverteilung in einem Rhizoid. Die Anlage der neuen Zellwand ist in den ersten Anfängen sichtbar (oben im Bild).

#### f) Die Anlage der neuen Zellwand

Die Bildung der Zellwand hat schon H. v. Mohl (1845) bei *Cladophora* beobachtet und bezeichnet sie als Einschnürung des „Primordialschlauches“. Ähnlich beschrieben Pringsheim (1854) und Nägeli (1855) den Vorgang. Auch Strasburger (1888) löst diese Frage nicht endgültig, ebensowenig Brand (1901), der eine Loslösung des Protoplasten von der Zellwand bei der Zellteilung vermutet. Tischler (1934), Sharp-Jaretsky (1951) und Guilliermond (1933) schließen sich Brand

an. L a n z (1940) findet aber in den Zellkanten an der neuen sich bildenden Querwand Protoplasma, was auch Plasmolyseversuche deutlich bestätigen. Aus neueren Arbeiten (Z e p f 1952, B ü n n i n g, H u n c k und L u t z 1953) weiß man, daß spezifische Differenzierungen des Plasmas zur Anlage von Wandversteifungen usw. führen. Auch bei den Cladophoraceen ist eine Verdichtung des Plasmas vor und während der Querwandbildung zu beobachten. Der Protoplast scheint dabei mechanisch verlagert und geteilt zu werden, eine erhöhte Färbbarkeit der umgebenden Zellkerne folgt der primär auftretenden Plasmaanhäufung. Dies veranschaulicht ebenfalls die plasmatische Aktivität in diesem Zellbereich.

#### 4. Dichtemessungen an lebenden und fixierten Zellen

Es sollte versucht werden, auch quantitative Einblicke in den Verlauf des Plasmawachstums zu gewinnen. B ü n n i n g (1951) hat eine Methode angegeben, die nach dem Prinzip des Registrier-Photometers aufgebaut ist und einfach arbeitet. Sie liefert Unterschiede in der Dichte der Zellen.

Die eigene Meßanordnung bestand aus einem Mikroskop mit dem Spaltokular nach Dr. B. Lange und der Selenphotozelle S 20. Die Messung erfolgte mit einem Multiflexgalvanometer MG 1 (Lange). Als Lichtquelle diente eine Niedervoltlampe von Zeiß-Winkel. Mit dieser Anordnung wurde die prozentuale Durchlässigkeit der Objekte gemessen. 100% Durchlässigkeit ( $D$ ) entspricht einer Transparenz  $T = 1$  und einer Dichte (Schwärzung) von 0, wobei die Dichte  $D = \lg \frac{1}{T}$  ist.

Aus den Objekten wurde zur Messung jeweils ein Ausschnitt von  $25 \mu^2$  ausgeblendet, das Präparat konnte durch das Spaltokular beobachtet werden. War nur der Objektträger im Strahlengang, so wurde das Galvanometer auf den Ausschlag 100 = Dichte 0 einreguliert, was die Meßgrundlage für das betreffende Objekt darstellt. Mehrere Messungen an einer Stelle werden zu einem Mittelwert zusammengefaßt und bei Übereinstimmung an zehn Zellen in einem Kurvenpunkt abgebildet. Die Meßergebnisse können nur graduelle Unterschiede in der Protoplastendichte demonstrieren.

##### a) Messungen an lebenden Zellen

Die isolierten Zellen wurden im hängenden Tropfen in Nährlösung kultiviert. Auf einem Objektträger war ein Glasring (1 cm hoch und 1,5 cm breit) mit Vaseline aufgeklebt. Auf dem Boden dieser kleinen feuchten Kammer waren einige Tropfen Nährlösung. Je fünf isolierte Zellen kamen in einen Tropfen auf das Deckglas. Eine große feuchte Kammer nahm die Objektträger auf. Bei den Untersuchungen in vivo ist es unerlässlich, eine Küvette mit Kupfersulfatlösung dazwischen zu schalten, um eine letale Schädigung der Zellregenerate durch zu hohe Lichtintensitäten bzw. die Brennwirkung des optischen Systems zu verhindern. Die Messungen erfolgten im Abstand von je einem Tag.

Untersucht werden *Cl. fr. rivularis* und *Rhizoclonium*. Jede Zelle zeigt polare Protoplasmastruktur. Die Zellspitze hat eine größere Plasmadichte und enthält mehr Chloroplasten. Zum Zellende hin ist ein gleichmäßiger Abfall der Dichte festzustellen. Die Werte streuen zum Teil sehr, so daß man zu keinen absoluten quantitativen Ergebnissen kommen kann. Doch läßt sich mit dieser Methode folgendes aussagen: Einen Tag nach der

Isolierung steigen die Werte am Zellende merklich an, was sich in den folgenden Tagen mit weiter steigender Dichte bestätigt. Es muß also eine

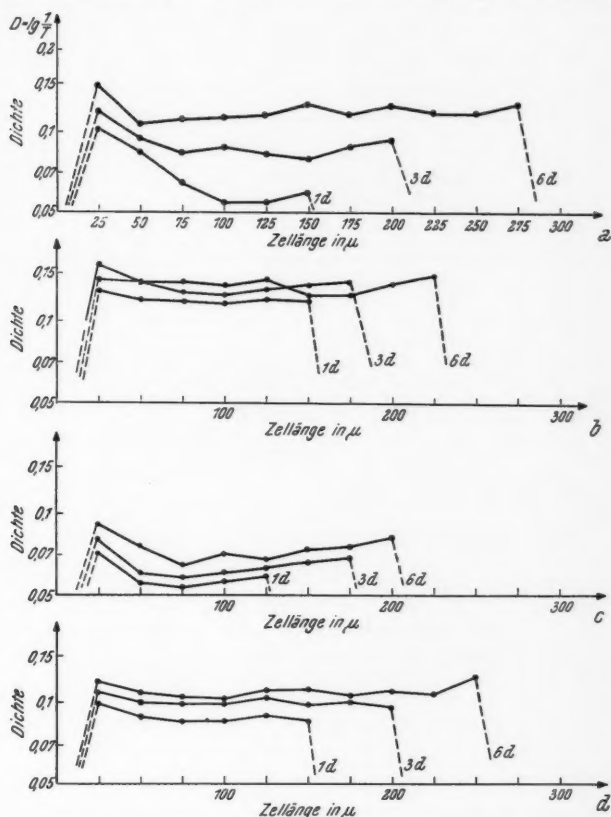


Abb. 7 a. *Cladophora fracta rivularis*. Die Protoplastendichte an lebenden Zellen 1, 3, 6 Tage nach der Isolierung. Die Abszisse stellt die Länge der gemessenen Zellen in  $\mu$  dar. Die Ordinate gibt ein Maß für die Dichte, wobei  $D = l g \frac{1}{T}$  ist.

Abb. 7 b. *Cladophora fracta rivularis*. Die Dichte bei fixierten Zellen mit 1, 3, 6 Tagen Abstand.

Abb. 7 c. *Rhizoclonium hieroglyphicum*. Dichtemessungen an lebenden Regeneraten am ersten, dritten und fünften Tag nach der Isolierung.

Abb. 7 d. *Rhizoclonium hieroglyphicum*. Die Dichte bei fixierten und gefärbten Regeneraten nach 1, 3 und 5 Tagen Regenerationszeit.

polare Neubildung einsetzen, während in den anderen Zellbereichen die Werte ungefähr gleich bleiben. Vom vierten bzw. dritten Tage an wächst die Dichte in der Zellmitte an, zur Basis hin nimmt sie ein wenig ab, um

gegen das Zellende zu wieder anzusteigen. Diese Verhältnisse werden immer deutlicher, bis sich das Rhizoid an der Stelle abgliedert, wo der Zellwandbildung die Protoplasmaverdichtung vorausgegangen ist. Mittels dieser Methode läßt sich schon sehr früh die Stelle zeigen, an der die neue Zellwand entsteht (vgl. Abb. 1a und 1c).

#### b) Messungen an fixierten Zellen

In weiteren Versuchsreihen wurden Zellregenerate mit je einem Tag Abstand fixiert, mit Hämatoxylin gefärbt und eingebettet. Als Material diente ebenfalls *Cladophora fracta rivularis* und *Rhizoclonium*. Bei diesen Auswertungen wurden nur Bereiche außerhalb der Zellkerne gemessen. An diesen Präparaten ist im wesentlichen dasselbe zu beobachten wie bei den Messungen an lebenden Objekten. Schon einen Tag nach der Isolation steigt am basalen Zellende die Plasmadichte an. Nach drei Tagen werden Werte erreicht, wie man sie zunächst nur an der Zellspitze antrifft. Auch läßt sich die Plasmaverdichtung in der Zellmitte etwa vom dritten Tage an beobachten, die zur folgenden Ausbildung der Zellwand führt. Die Zellwand wird in der Mitte der dichteren Plasmamasse nach 5–6 Tagen angelegt und somit das Rhizoid abgetrennt (vgl. Abb. 1b und 1d).

### 5. Versuche zur Vitalfärbung der regenerierenden Zellen

#### a) Fluorochromierung mit Akridinorange-Auramin

Bei den nachfolgend beschriebenen Versuchen diente als Lichtquelle eine Quecksilberhöchstdrucklampe HBO 200 (Osram), als Lichtfilter UG 1 und BG 12 (Schott, Mainz) zur Erregung der Primärstrahlung, als Okularsperrfilter das OG 4 (Schott) mit einem Mikroskop Standard Junior (Zeiß-Winkel).

Nach eingehenden Versuchen hat sich gezeigt, daß die übliche Konzentration 1 : 10.000 des Farbstoffes Akridinorange keine günstigen Ergebnisse zeitigt. Schon nach 10 Min. Färbezeit trat eine Schädigung der *Cladophora*-Zelle ein. Der Zellstoffwechsel wird dabei so verändert, daß sich alsbald eine Akinete bildet, ganz einerlei, ob der Farbstoff in Nährlösung, Leitungswasser, dest. Wasser oder Puffer gelöst ist und die Algen hernach wieder ausgewaschen werden. Diese Akinetenbildung hat schon Cholnoky (1950) nach Behandlung der *Cladophora*-Zelle mit 0.2–0.02% Kokainlösung erreicht. Zwar führen obige Versuche nicht zur Letalschädigung; denn die gefärbten Zellen können über zwei Jahre in Form der Dauerzellen in Kultur gehalten werden. Durch öfteres Wechseln der Nährlösung lassen sie sich zu neuem Wachstum anregen.

Zur Ausschaltung des photodynamischen Effektes habe ich Versuche mit Zusatz von Saccharose, Glukose und Maltose unter Lichtausschluß unternommen, jedoch ohne positiven Erfolg. Die Algenzellen lassen sich also nicht fluorochromiert kultivieren.

Bei weiteren Versuchen zeigt sich, daß ein Zusatz von Auramin einen günstigen Einfluß auf die Färbbarkeit hat und damit auch auf die Fluoreszenzanregung. Ich habe dazu jeweils Lösungen in Leitungswasser im Verhältnis 1 : 100.000 hergestellt und die Akridinorange- und Auraminlösung im Verhältnis 2 : 1 gemischt. Die Färbedauer betrug etwa 1–2 Std. Danach wurde in Leitungswasser ausgewaschen und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Eine Weiterkultur einzelner Zellen ist auch unter diesen Umständen nicht möglich, selbst bei einer Farbstoffkonzentration



von 1 : 1 Mill. nicht. Doch kann die Fluorochromierung als Indikatormethode zur Untersuchung der einzelnen Regenerationsstadien herangezogen werden.

An Hand solcher Präparate verschieden alter regenerierender Zellen ist feststellbar, welche Teile der Zelle zu besonderen Leistungen im Verlauf der Regeneration befähigt sind. — Zu den Versuchen habe ich *Cladophora fr. rivularis*, *Cladophora crispata* und *Rhizoclonium hieroglyphicum* verwendet.

#### b) Der Kern

Bei allen drei untersuchten Arten färben sich die Zellkerne gleich und homogen an, nur treten sie, bisweilen durch die Chloroplasten verdeckt, nicht in Erscheinung, sie fluoreszieren hellgrün. Schon einen Tag nach der Isolierung kann man eine deutlich stärkere Fluorochromierung der basalen Zellkerne beobachten. Im Laufe der Regeneration sind stets die Zellkerne stark fluoreszierend, die sich an Wachstumsstellen befinden. Überdies lassen sich Kernteilungsfiguren beobachten, Einzelheiten sind jedoch infolge gegenseitiger Überstrahlung bei der Kleinheit der Objekte nicht zu unterscheiden.

#### c) Das Plasma

Mit dem Akridinorange-Auramin-Gemisch läßt sich im besonderen eine gute Plasmafärbung *intra vitam* erzielen. Das Plasma fluoresziert leuchtend hellgelb. In chloroplastenarmen Zellen kann man deutlich die Kammerung der Vakuolen beobachten, da die Plasmastränge sichtbar werden, die sich durch das Zellumen ziehen. Dies deutet wiederum darauf hin, daß das wachsende Plasma die größte Affinität zu den Fluorochromen hat. Damit kann gezeigt werden, an welcher Stelle das Wachstum in der einzelnen Zelle lokalisiert ist.

#### d) Die Zellwand

Die Zellmembran fluoresziert bei den *Cladophora*-Arten im allgemeinen gleißend kupferrot, an Stellen stärksten Wachstums hellrot. In anderen Zellteilen findet man Farbabstufungen bis zum tiefen Dunkelrot. Entsteht am Zellregenerat die neue Zellwand, so ist ein deutlich hellroter Ring mindestens 2 Tage vor der Ausbildung der Membran zu beobachten. Ebenfalls tritt bei der beginnenden Bildung des Zellwandporus im frühen Stadium der Zoosporenentstehung an dieser Zellwandstelle eine ausgeprägte Rotfluoreszenz auf.

Der photodynamische Effekt und die Giftwirkung des Akridinorange, das als Chlorzinkdoppelsalz des 3,6-Tetramethyldiaminoakridins vorliegt, waren bei den Versuchen deutlich. Betz (1955) hat das gleiche Resultat entgegen den Angaben Struggers (1947 und 1949) bei den Staminalhaaren von *Tradescantia virginica* erzielt. Auch Stich (1951) hat bei kernlosen *Acetabularia*-Regeneraten einen hemmenden Einfluß von Akridinorange auf die Plasmavermehrung feststellen können, und damit erweist sich, daß die Hemmung nicht am Zellkern einsetzt. Da Akridinorange ein basischer Farbstoff ist, kann er nur mit freien sauren Gruppen reagieren, die sich im Sinne von Frey-Wyssling (1955) aus dem Netzgerüst des Protoplasmas anbieten. Trotz der großen Verdünnung des

Farbstoffes bei den Versuchen löst er eine Hemmung aus, die Zellregeneration kommt zum Stillstand, weil neben den oben erwähnten Tatsachen die Speicherung der Farbstoffe zur Schädigung führt. Außer den von Betz (1955) festgestellten Giftwirkungen auf das Chromatin bedingt die Färbung auch eine Schädigung des Protoplasmas. Bogen (1953, 1954) hat sich in Versuchen an Hefezellen mit dem Stoffwechsel nach Akridinorange-Färbung beschäftigt. Er hat in allen Zellen bei Farbstoffüberschuß, gleich



Abb. 8.

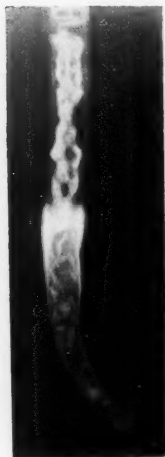


Abb. 9.



Abb. 11.

Abb. 8. *Cladophora fracta rivularis* ( $12 \times 10$ ). Kerne, Plasma und Granula mit Akridinorange-Auramin fluorochromiert und im Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

Abb. 9. *Cladophora crispata* ( $12 \times 10$ ). Der Apikalpol ist stärker fluorochromierbar, ebenso die Zellwand in der „Streckungszone“.

Abb. 11. *Cladophora fracta rivularis*. Die Bildung der neuen Zellwand wird sichtbar nach 4 Tagen ( $12 \times 40$ , Ao-Au).

welchen Alters sie sind, Rotfluoreszenz beobachtet. Das läßt sich auch bei den untersuchten *Cladophora*-Arten aufzeigen. Die maximale Anfärbung ist bei einer Konzentration von 1:100.000 nach 5 Std. erreicht. Der Stoffwechsel ist blockiert, was die Ausbildung der Akineten herbeiführt, wenn die regenerierenden Zellen in neue Nährlösung gebracht werden. Das Akridinorange erweist sich ebenfalls für die Algenzelle als Zellgift. Auf Grund der Beobachtungen über das Verhalten der Ribosenucleinsäure (RNS) während der Regeneration ist es höchstwahrscheinlich, daß das Akridinorange an die RNS-haltigen Plasmakomponenten absorbiert wird, weil die Teile der Zelle, die die stärkste Fluorochromierung zeigen, auch die größte RNS-Anhäufung besitzen. So liegt es bei der *Cladophora*-Zelle

nahe, daß das Akridinorange die RNS blockiert, besonders in den wachsenden Teilen des Protoplasten. Somit dürften, entsprechend den Ausführungen Bogens und Kessers (1954), die Matrizen der Proteinsynthese nicht mehr aktionsfähig sein. Der Neu- und Wiederaufbau plasmatischer Komponenten ist nicht mehr möglich. Mit dieser Erscheinung geht die Destruktion der Zelle einher, was sich in der Speicherung des Akridinorange in der Vakuole äußert. Diese Farbstoffbrocken fluoreszieren gleißend rot. Die Hemmung der Proteinsynthese löst die Proteolyse aus, wie Bogen und Kesser (1954) an Hefezellen gefunden haben. Morthland et al. (1954) haben eine große Anzahl von Aminoakridin-farbstoffen auf ihre Fähigkeit der Färbung von Nucleinsäuren hin untersucht. Sie fanden, daß es sich bei der Bindung Nucleinsäure-Farbstoff nicht um eine einfache elektrostatische handeln kann. Als bedeutend wird die Aminogruppe am Akridinsystem erkannt. Stockingers Untersuchungen (1954) an Gewebekulturen isolierter Hühnerfibroblasten veranschaulichen die Schädigungen mit den gleichen Ergebnissen: Mitosehemmung, Entmischungen im Plasma, Verdickung und Zerfall der Mitochondrien. All das ist ebenfalls bei der Anfärbung der Zellregenerate von *Cladophora* festgestellt worden. Zwar läßt die Färbung mit Akridinorange-Auramin keine endgültigen Schlüsse zu, doch ist vielleicht von hier aus durch die Blockierung der Proteinsynthese bzw. des Aufbaues der RNS der Frage näherzukommen, wie das Wachstum bei der Regeneration gesteuert wird.

#### e) Versuche mit anderen Fluorochromfarbstoffen

Eine Reihe weiterer zur Verfügung stehender Fluorochrome habe ich zur Untersuchung verschiedener Zellelemente angewandt. Die Farbstoffe wurden in Leitungswasser gelöst (1 : 10.000), 10–30 Min. wurde angefärbt, anschließend in Leitungswasser ausgewaschen und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. — Zu diesen Versuchen wurden *Cl. crispata*, *Cl. fr. rivularis* und *Rhizoclonium* verwendet.

Perner (1952) und Drawert (1953) geben das Alkaloid Berberinsulfat zur spezifischen Färbung der Chondriosomen an. Die eigenen Beobachtungen zeigen folgendes: Nach 10 Min. Färbezeit fluoresziert die Membran bei den lebenden Zellen weißgrünlich, tote nehmen keine Farbe auf. Nach 30 Min. hat sich dieses Bild verändert. Die wachsenden Teile der Zellwand an der Zellbasis leuchten intensiv weißgelb, stärker als die ruhende Membran. An den apikalen Polen erscheinen die Plasmagranula

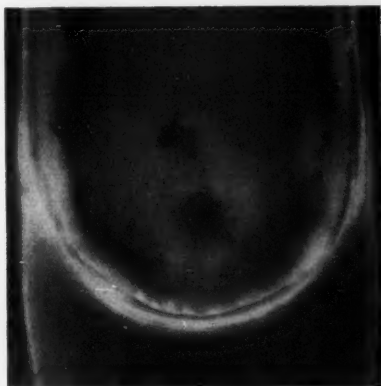


Abb. 10. *Cladophora crispata*. Die Fluoreszenz der Chondriosomen mit Berberinsulfat an der basalen Spitze (12×63).

hellgoldgelb, während im übrigen Plasmawandbelag nur vereinzelte Punkte aufleuchten. Diese Erscheinung tritt schon wenige Stunden nach der Zellisolation an der Zellbasis auf, jedoch kann dabei nicht genau ermittelt werden, ob eine polare Verlagerung der Chondriosomen stattfindet oder eine sehr rasche Teilungswelle einsetzt. Letzteres ist wohl das Wahrscheinlichere. Während der ganzen Regenerationsdauer bleiben diese Befunde ähnlich. Setzt das apikale Wachstum ein, dann treten die gleichen Vorgänge auf. Nach einer Stunde Färbezeit wird der Farbstoff in der Vakuole gespeichert und fluoresziert weißgelb. Die Plasmagranula sind verklebt, eine Schädigung wird sichtbar.

Nach 30 Min. Färbezeit mit Nilblausulfat sind die Sphärosomen im Plasma zu erkennen, sie fluoreszieren goldgelb. Bei *Cl. crispata* treten sie besonders deutlich an der Längswand in der Nähe der Zellpole auf. Sie sind erst zwei Tage nach der Isolierung in vermehrter Zahl zu erkennen. Die Apikal- und Basalpole selbst bleiben ungefärbt, die Chloroplasten fluoreszieren wie bei den anderen Färbungen ebenfalls rot. Das Bild ist äußerst lichtschwach, auch bei den beiden anderen Arten, bei denen sich dieselben Feststellungen machen lassen.

## 6. Bestimmung des isoelektrischen Punktes einzelner Zellbestandteile

Diese Versuche basieren auf Untersuchungen von Schwantes (1952), der die Lage des isoelektrischen Punktes (= Entladungspunkt) mit Akridinorange bestimmt hat. Die Wirkung dieses Farbstoffes beruht darauf, daß oberhalb des Entladungspunktes ein Farbumschlag von Grün über Orange nach Kupferrot erfolgt. Der Grund hierfür ist die elektroadsorptive Speicherung von Farbstoffkationen, die um so stärker ist, je mehr Einlagerungsmöglichkeiten vorhanden sind. Das bedeutet, daß oberhalb des Entladungspunktes (=  $IEP_M$ ) eine Rotfärbung auftritt, unterhalb dagegen nur grünfluoreszierende Imbibitionsfärbung, weil beim intakten Plasma wenige Haftpunkte für die Kationen frei sind. Totes Plasma ist durch die Denaturierung der Eiweißkörper zu stärkerer Farbstoffspeicherung befähigt. Am fixierten Protoplasten kann man mittels dieses Farbumschlages in bestimmtem pH-Bereich von Grün nach Orange den mittleren isoelektrischen Punkt ( $IEP_M$ ) bestimmen.

Für diese Untersuchungen diente *Cl. fr. ripularis*. Die Zellregenerate wurden in Abständen von einem Tag in 70% Äthanol fixiert und in üblicher Weise aufgeklebt. Eine gepufferte Farbstoffreihe mit Akridinorange (1:10.000) und eine farblose Puffergemischreihe mit 0,5 pH-Abstand (Acetat- und Phosphatpuffer) wurden zur Farbanalyse benutzt. Die Präparate wurden 1–2 Std. in die gepufferte Farbstofflösung gestellt und danach 20 Min. in Puffer gleichen pHs ausgewaschen. Anschließend wurden die Zellregenerate im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Ist kein Farbumschlag erfolgt, so wurde in die nächst niedrigere Stufe übertragen und so fort.

Bei den Zellregeneraten ergibt sich eine klare polare Differenzierung zwischen den wachsenden Spitzenregionen und den „ruhenden“ Teilen der Zelle. Tab. 2 vermittelt einen Überblick über den  $IEP_M$  von Zellkernen und Zytoplasma. — Man ersieht daraus, daß in den wachsenden Zellpartien der  $IEP_M$  des Kernes durchschnittlich bei pH 6,2 liegt, das Plasma bei pH 5,9 im wesentlichen den Entladungspunkt hat. Für die ruhenden Zellteile findet man etwas niedrigere Werte: IEP-Plasma pH 5,5–5,6, IEP-Kern pH 5,6–5,9. In dieser Versuchsreihe haben die meisten Zellen nach 8 Tagen das Rhizoid ausgebildet, hierauf setzte das apikale Wachstum ein.

Tabelle 2. Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes bei *Cladophora fracta rivularis* mit Akridinorange.

Die Zahlen geben die pH-Werte des Farbstoffumschlags an (+++ 100% der untersuchten Zellen zeigen den Umschlag von Grün nach Orange, ++ 75%, + 50%; — kein Umschlag der Farbe).

Alter des Zell-regenerates	Ruhende Kerne	Kerne in Wachstumszone	Plasma in ruhendem Zustand		Plasma an wachsenden Stellen
1 Tag	6,2 ++	6,5 +	5,9 +	5,3 ++	6,5 — 5,9 ++
	5,9 +++	6,2 ++	5,6 ++	5,0 +	6,2 ++ 5,6 +
	5,6 +	5,9 +			
2 Tage	6,2 +	6,5 ++	5,9 +	5,3 ++	6,2 + 5,6 +
	5,9 +++	6,2 +++	5,6 +	5,0 +	5,9 +++
	5,6 +	5,9 +			
3 Tage	6,2 +	6,5 ++	5,9 —	5,3 ++	6,2 — 5,6 +
	5,9 ++	6,2 +++	5,6 ++	5,0 —	5,9 ++
	5,6 +	5,9 +			
4 Tage	6,2 +	6,5 ++	5,9 —	5,3 ++	6,2 + 5,3 +
	5,9 ++	6,2 ++	5,6 +	5,0 —	5,9 +++
	5,6 +	5,9 +			
5 Tage	6,2 +	6,5 +	5,9 —	5,3 ++	6,2 + 5,3 +
	5,9 +++	6,2 ++	5,6 +	5,0 +	5,9 +++
	5,6 ++	5,9 +			
6 Tage	6,2 +	6,5 ++	5,9 +	5,3 ++	6,2 +
	5,9 ++	6,2 +++	5,6 ++	5,0 —	5,9 ++
	5,6 —	5,9 —			5,6 +
7 Tage	6,2 +	6,5 ++	6,2 +- 5,3 +++		6,2 ++
	5,9 +++	6,2 ++	5,9 + 5,0 —		5,9 +++
	5,6 +	5,9 +	5,6 ++		5,6 +
8 Tage	6,2 +	6,5 +	6,2 + 5,3 ++		6,2 ++ 5,6 ++
	5,9 ++	6,2 +++	5,9 + 5,0 +		5,9 +++
	5,6 —	5,9 —	5,6 +++		
10 Tage	6,2 ++	6,5 +++	5,9 ++ 5,3 +		6,2 + 5,6 +
	5,9 +++	6,2 +++	5,6 +++ 5,0 +		5,9 +++
	5,6 —	5,9 +			
12 Tage	6,2 ++ 6,5 ++	6,5 ++	5,9 + 5,3 ++		6,2 +
	5,9 +++	6,2 +++	5,6 ++ 5,0 —		5,9 +++
	5,6 —	5,9 +			5,6 +
		5,6 +			5,3 +

Soweit sich feststellen läßt, liegen hier die Entladungspunkte etwas höher als an der Zellbasis. Der IEP der Zellkerne liegt bei pH 6,2–6,5, der des Plasmas bei pH 5,9; dieser Wert ist sehr konstant.

Bei diesen Versuchen fällt es auf, daß die gefundenen Werte höher liegen und die Differenzen weniger groß sind als bei den von Schwantes untersuchten Pilzmycelien von *Phycomyces* und *Penicillium*. Jedenfalls läßt sich sagen, daß mit zunehmendem Alter des Plasmas und der Zellkerne der IEP sich mehr zum sauren Bereich hin verlagert. In den Basal- und Apikalpolen ist immer der höchste Entladungspunkt lokalisiert. Jedes Eiweiß hat einen spezifischen isoelektrischen Punkt, ändert er sich beim Plasmawachstum, so werden andere Mischungsverhältnisse entstehen, was möglicherweise in der Synthese neuer Eiweißkörper seine Ursache haben kann, damit geht aber die Verschiebung des Entladungspunktes einher.

## 7. Mikrochemische Farbreaktionen an Zellregeneraten

### a) Nachweis von Ribose- und Desoxyribosenucleinsäure mit Phenylfluoron

In den Jahren 1945–1945 hatten Turchini und Mitarbeiter (weitere Literatur siehe dort) ein Reagens auf Zucker gefunden, das 9-phenyl-2,3,7-trihydroxy-6-fluoron (Merk bzw. Light, London). Diese Nuclealreaktion erlaubt nach vorangegangener Hydrolyse die Desoxyribose- (DNS) und Ribosenucleinsäure (RNS) zu erkennen. Die Methode läßt sich bei Pflanzen anwenden und färbt die DNS blauviolett, die RNS rosarot, außerdem tingieren sich nach längerer Hydrolyse andere Zellzuckerkomponenten. Die Reaktion ist relativ leicht auszuführen, muß aber für jedes Objekt erprobt werden. Überdies hat sie den Vorteil, daß Fixierungsartefakte nicht gefärbt werden.

Die Zellregenerate wurden in Tagesabständen 1 Std. mit dem Fixierungsgemisch behandelt, danach 2 Std. in Leitungswasser ausgewaschen. Hierauf kamen die Zellen zur Hydrolyse 30 Min. in alkoholische, 25% konzentrierte, kalte Salzsäure. Nach kurzem Abspülen mit 90%igem Alkohol wurden die Algen 1–2 Std. in das Reagens gebracht. (Man löst 80 mg Phenylfluoron in 100 ml 95%igen Alkohol und fügt 15 Tropfen konz. Schwefelsäure hinzu. Das Reagens ist haltbar.) Danach wurden die fixierten Zellen kurz mit dest. Wasser abgespült und für 1–2 Std. in eine 1%ige Natriumkarbonatlösung in Wasser gelegt, die rasch verbraucht wird und deshalb oft zu erneuern ist. Nach kurzem Abspülen mit Wasser wurden die Zellregenerate auf den Objektträger übertragen und mit Celodal (Bayer) eingedeckt. Dieses Einbettungsmittel eignet sich ebenfalls für die Hämatoxylinfärbung und andere; entsprechender Zusatz von Wasser verhindert das Schrumpfen beim Übertragen.

Zu diesen Versuchen habe ich hauptsächlich *Cladophora fracta rivularis*, *Cl. crispata* und *Rhizoclonium* verwendet. Im Zellfaden zeigen alle Zellkerne eine klare, blauviolette Färbung. Die Zellkerne erscheinen vollkommen homogen, der Nucleolus ist deutlich als helle Kreisscheibe zu sehen. Bei Mitosestadien heben sich die stärker gefärbten Chromosomen vom blaßblauviolett tingierten Kernraum ab. Zellkerne in den Wachstumszonen weisen einen leichten Rotstich auf, was wohl vom höheren RNS-Gehalt



herrührt. Vereinzelt kann man nach der Mitose einen schwachrosa gefärbten Hof um den Kern beobachten. Primär sind bei Beginn der Regeneration die stärker färbbaren Plasmagranula am Basalende festzustellen und im Verlauf der Regeneration bleibt immer nur die äußerste Wachstumsspitze im Plasma färbbar, die anderen Zellteile sind außer den Kernen nahezu farblos. Anders ist es an der apikalen Spitze. Dort scheint die ganze Zellspitze in einem embryonalen Zustand zu bleiben, bis sie zu normaler Größe herangewachsen ist; sie zeigt eine gleichmäßige Tinktion, an der Spitze vertieft sich die Farbe etwas. — Daß die rosarote Färbung RNS anzeigt, kann bestätigt werden; ich hydrolisierte Zellregenerate 24 Std. in 5%iger kalter Perchlorsäure, die dieselbe Wirkung wie Ribonuclease hat; nach Behandeln mit Phenylfluoron lassen sich nur die Zellkerne noch anfärben, die Nucleole werden nicht sichtbar.

Nach Jacobson und Webb (1952) läßt sich im Cytoplasma, durch das der Kern bei der Mitose gewandert ist, durch UV-Absorption Nucleinsäure nachweisen. Die Reaktion mit Phenylfluoron zeigt nach der Kernteilung einen Hof mit rosaroter Färbung um den Kern (RNS), was diese Ergebnisse bestätigen würden. Das bedeutet, daß man von zwei Phasen plasmatischen Wachstums sprechen kann: Einerseits wird das Plasma in plasmacigenen Bereichen aufgebaut aus Komponenten, die im Protoplasma synthetisiert werden, andererseits liefern die Zellkerne ebenfalls Bausteine. So zeigt sich auch bei diesen Untersuchungen, daß Plasma und Kern bei den komplizierten Vorgängen der Zellregeneration gleichermaßen beteiligt sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß höchstwahrscheinlich die Verteilung und Lage der RNS für den Wachstumsprozeß von ausschlaggebender Bedeutung ist. Diese Ergebnisse stehen somit in Einklang mit denen von Caspersson (1950), Brachet (1950) und Haurowitz und Crampton (1952), die jedoch auf anderem Wege gewonnen worden sind.

#### b) Nachweis von Metaphosphaten

In neueren Arbeiten (Stich 1953, Windisch et al. 1953) hat sich immer wieder gezeigt, daß die Ausbildung von Metaphosphaten vom physiologischen Zustand der Zelle abhängig ist und damit einen Einblick in das physiologische Zellgeschehen vermitteln kann.

An Bakterien haben Windisch, Stierand und Haehn die Methylenblau-Trypaflavin-Reaktion (M-T-Test bezeichnet) erprobt, außerdem an über zehn phosphorhaltigen Testsubstanzen anorganischer und organischer Natur. Dabei haben sie gefunden, daß diese M-T-Methode auf alle Phosphorverbindungen anspricht, die mindestens zwei freie Valenzen haben. Für diese Untersuchungen war es bedeutend, daß der M-T-Test sich an unfixierten Zellen ausführen läßt und so die Zellen vor der Denaturierung bewahrt bleiben. Die indikative Bedeutung der Doppelfärbung liegt darin begründet, daß eine starke, salzartige Verbindung zwischen den Nucleinsäuren und dem basischen Methylenblau entsteht. Durch die Nachfärbung mit Trypaflavin (ein stärker basisches Akridinderivat) wird ein phosphornucleinsaures Farbstoffsalz gebildet.

Zur Färbung der unfixierten Zellen wird folgendermaßen verfahren: Die Zellregenerate kamen 6 Min. in die Methylenblaulösung (1 g Farbstoff + 1 g Phenol in

25%igem Äthanol lösen), anschließend 30 Min. in 0,8%ige Natriumchloridlösung in Wasser, darauf folgte 5–10 Min. lange Behandlung in 1%iger Schwefelsäure, 10–15 Min. verblieben danach die Präparate in dest. Wasser und wurden zum Schluß in die Trypaflavinlösung (0,1 g Trypaflavin in 200 ml dest. Wasser lösen) gebracht. Hierauf wurde in 70%igem salzsaurem Alkohol 30–60 Min. lang differenziert, je nachdem, wie stark die Plasmafärbung ausfallen soll, anschließend in Balsam (Celodal) eingedeckt. Als Algenmaterial wurde *Cl. fr. lacustris*, *Cl. fr. rivularis* und *Rhizoclonium* verwendet.

In den ersten Tagen ist in den Zellen kaum eine Veränderung wahrzunehmen. Vom dritten Tage an ist bei allen drei Arten zu beobachten, daß der Basalpol fast ganz frei von Farbstoffgranula ist, der Apikalpol ist etwas stärker gefärbt. Eine deutliche Farbstoffhäufung ist in der Zone sichtbar, die die meisten Chloroplasten enthält. Eine weitere Entfärbung ist bei der Anlage der neuen Zellwand im Stadium der Rhizoidabgliederung zu bemerken. Ist das Rhizoid ausgebildet, dann läßt sich an der apikalen Spitze, wenn dort das Wachstum intensiviert wird, ebenfalls an der äußersten Spitze eine völlige Entfärbung beobachten.

Da der M-T-Test keine spezifische Reaktion auf Nucleinsäuren darstellt, vielmehr nur Zellphosphate indiziert und lokalisiert, liegt der Schluß nahe, daß an den Orten reger Plasmataktivität diese Zellphosphate verbraucht werden, während sie sich bei Häufung der Chloroplasten anreichern. Stich (1955) sagt, daß der Metaphosphathaushalt durch zwei Prozesse geregelt ist: 1. Bildung durch die Intensität der Photosynthese und 2. Verminderung durch die Stärke der Wachstumsprozesse. Obwohl er für analoge Versuche Toluidinblau verwendet hat, stimmen beide Ergebnisse vollkommen überein.

#### c) Reaktion mit Fuchsin nach Hydrolyse

Preuner und v. Prittwitz-Gaffron (1952) untersuchten die Reduktionsorte und ihren Zusammenhang mit den sogenannten Nucleotiden bei *Bacillus mycoides*. Ich habe diese Methodik bei *Cladophora fr. lacustris*, *Cl. fr. rivularis* und *Rhizoclonium* angewandt. Die Hydrolyse erfolgte 30 Min. in 5%iger kalter Perchlorsäure, danach wurde in Leitungswasser ausgewaschen und 20 Min. in 0,05% basischer Fuchsinlösung gefärbt, 2 Min. in 2%iger Phosphormolybdänsäure gebeizt, in Alkohol hochgeführt und in Balsam eingedeckt. Dabei kann man in den verschiedenen Stadien der Zellregeneration beobachten, daß die basalen und bei Regeneraten mit ausgebildeten Rhizoiden die apikalen Wachstumsspitzen stärker angefärbt sind als die übrigen Zellteile. Die Nucleolen sind nicht zu erkennen. Es kann sich also um keine RNS-Anfärbung handeln. Bei *Rhizoclonium* tritt dieser Befund besonders hervor. Nach 8 Std. Regenerationszeit ist eine deutliche basale Färbung zu sehen. In den nächsten beiden Tagen wird dieses Bild noch klarer, später läßt die Färbbarkeit dieser wachsenden Zellpartien wieder nach. Einerseits führt diese Technik nicht zur Feulgenschen Nuclealreaktion, andererseits sind diese Orte nicht mit denen der Formazaneinlagerung nach Behandeln mit Triphenyltetrazoliumchlorid zu identifizieren.

Die Untersuchungen der Zellregenerate mit Fuchsin nach Hydrolyse bestätigen, daß in den Zellregionen mit erhöhter Plasmataktivität Nucleotide gebildet werden müssen, da sie bei der Zellisolation noch nicht nachzuweisen sind.

### 8. Versuche mit radioaktiven Atomarten P-32 und S-35

Auf Grund der Einlagerung der Fluorochromfarbstoffe in die wachsende Zelle bei der Regeneration liegt es nahe, mit radioaktiven Atomarten zu bestätigen, ob an diesen Stellen wirklich die größte Aufnahme an Ionen aus der Nährlösung stattfindet oder ob sie sich über die ganze Zelle gleichmäßig erstreckt.

#### a) Aufnahme von P-32 und S-35 in die regenerierende Zelle

Als geeignete Isotope haben sich P-32 mit einer Halbwertszeit von 14,1 Tagen und S-35 mit einer Halbwertszeit von 88 Tagen als brauchbar herausgestellt, da diese Elemente auch in der normalen Nährlösung geboten werden. P-32 steht als Orthophosphation zur Verfügung, S-35 als Sulfation. Die Nährlösung war mit Spezial-Indikatorpapier (Merck) mittels  $K_2CO_3$ -Puffer auf pH 7,6 eingestellt. Die radioaktiven Substanzen wurden in einer Konzentration von  $2 \mu C/ml$  geboten, die Einwirkungsdauer war 2 Tage. Zum Nachweis und für die genaue Lokalisation der radioaktiven Bausteine ist die Autoradiographie gut geeignet. Für diese Versuche wird die Emulsion Kodak Autoradiographic NTB 2 verwendet (Pelc und Howard 1952).

Zur Präparation wurden die Zellen fixiert, ausgewaschen und mit Glycerin-gelatine aufgeklebt. Dies gewährleistet gleichzeitig ein gutes Haften der Filmschicht auf dem Objektträger. Entsprechend den Angaben der Herstellerfirma wird ein entsprechendes Stück des NTB-2-Films in Wasser gequollen, über den Objektträger gestreift und rasch in einem Ventilatorluftstrom getrocknet. In eine lichtdichte Büchse verpackt, werden die Präparate 14 Tage bei einer Temperatur von  $4^\circ C$  belichtet, um eine Ionenwanderung auf ein Minimum herabzudrücken. — Danach habe ich die Präparate in Kodak D 19 (3–4 Min.) entwickelt und fixiert. Nach dem Trocknen der Filmschicht habe ich in vorher beschriebener Hämatoxylinlösung gefärbt (1–3 Min.), in 1%iger wässriger Salzsäure differenziert und in Leitungswasser geschwärzt. Diese Färbung hat sich besser bewährt als die bisher üblichen, da die Färbezeit sehr kurz ist und die Filmschicht sich nahezu vollständig entfärben läßt. So treten bei mikroskopischer Betrachtung einerseits die Schwärzung — bedingt durch die zerfallenden Isotope —, andererseits die Zellstrukturen — der gefärbte Kern und etwas das Plasma — klar in Erscheinung. Zum Vergleich wurden ebenfalls ungefärbte Präparate hergestellt und Vergleiche angestellt.

Die Autoradiographien mit radioaktivem Phosphor zeigen folgendes Bild: P-32 wird relativ rasch in die Zelle aufgenommen und eingebaut. Schon nach 1 Tag zeigen sich bei *Rhizoclonium* und *Cladophora fr. rivularis* deutliche Schwärzungen an den basalen Enden der isolierten Zellen. Des weiteren wird auch P-32 in die Zellkerne eingebaut, und zwar in der Interphase. Das hat ebenfalls Taylor (1953) bei Infloreszenzen von *Tradescantia* und *Lilium* gefunden, wo P-32 und S-35 nur in einem Teil der Interphase eingebaut werden. Etwa 3–4 Tage nach der Isolierung

scheint eine vermehrte Aufnahme an Phosphor zu erfolgen, was sich darin äußert, daß über den meisten Kernen eine stärkere Schwärzung festzustellen ist. Dies ist besonders im Bereich des Basalpols auffällig. Vermutlich handelt es sich hier einerseits um einen Einbau in die Nucleolen

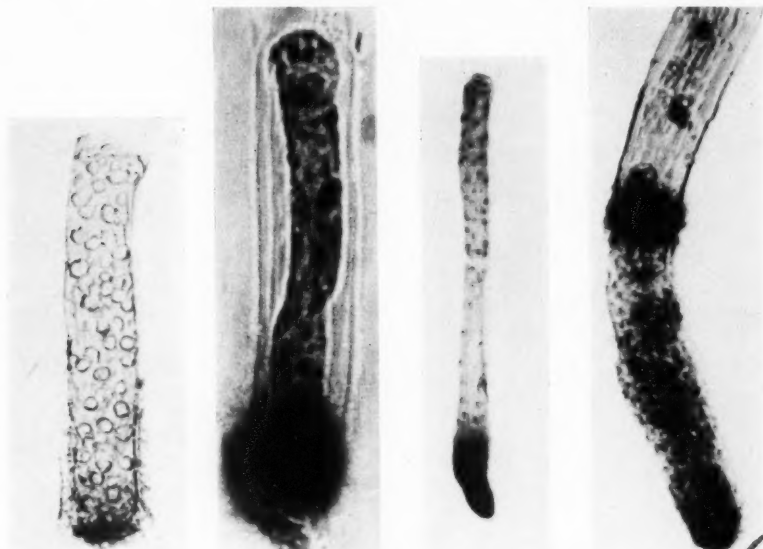


Abb. 12.

Abb. 13.

Abb. 14.

Abb. 15.

Abb. 12. *Cladophora fracta rivularis* einen Tag in radioaktiver Nährlösung kultiviert ( $2 \mu\text{C}/\text{ml}$  P-32). Die Autoradiographie zeigt an der Basis die Schwärzung der Filmschicht durch die zerfallenden Isotope, während apikal keine radioaktiven Ionen aufgenommen werden.

Abb. 13. *Rhizoclonium hieroglyphicum* mit S-35 markiert. Nach 2 Tagen Exposition ist ebenfalls nur ein Einbau an der Zellbasis erfolgt.

Abb. 14. *Cladophora fracta rivularis*. Bei einem zweizelligen Regenerat erfolgt die Aufnahme von S-35 zunächst nur am basalen Ende, weniger an der apikalen Wachstumsspitze.

Abb. 15. *Rhizoclonium hieroglyphicum*. Die größte Aufnahme von S-35 erfolgt an der Basalspitze und an der Stelle der Zellwandneubildung. Über den Zellkernen (besonders den Nucleolen) ist eine deutliche Schwärzung zu beobachten.

(als Ribonucleinsäure) und andererseits als DNS in die Chromosomen. Dieses Bild ändert sich nicht wesentlich im Verlauf der nächsten Regenerationsphase, bis die Zelle das Rhizoid abgliedert. An der Stelle der Zellwandbildung wird dann im Augenblick, in dem die nächstliegenden Kerne erneut in das Wachstum einbezogen werden, wieder P-32 eingebaut, aber auch im Plasma läßt sich P-32 nachweisen. Man hat es hier also mit einer stabilen Neueinlagerung zu tun. Aus den angefertigten Autoradiographien geht weiter hervor, daß die Ionen vorwiegend in Kerne aufgenommen

werden, die sich zur Teilung anschicken, wie oben schon erwähnt ist (Phase der identischen Reproduktion). Diese Feststellung ist in Einklang mit den Ergebnissen von Howard und Pelc (1951 und 1952) bei *Vicia faba*.



Abb. 16. *Cladophora crispata* ( $6 \times 40$ ). Bei der Anlage eines Seitenzweiges wird nur am Apikalpol S-35 in die Zelle eingebaut.

Die Aufnahme und der Einbau von radioaktivem Schwefel wurde an den gleichen Objekten untersucht (*Cladophora fr. rivularis* und *Rhizoclonium*). Nach 1 Tag Regenerationszeit ist noch keine Schwärzung zu identifizieren. — Am zweiten Tag jedoch ist an den Apikal- und Basalpolen eine starke Anhäufung von belichteten Silberkörnern zu beobachten. Ganze Abschnitte der Zelle an der Basalspitze sind völlig geschwärzt. Die Einlagerung von S-35 erfolgt vorwiegend im Cytoplasma, vereinzelt in den Nucleolen. Auch dies bestätigt die Befunde von Pelc und Howard (1952) beim Einbau von S-35 in die Bohnenwurzel.

Der direkte Einbau von S-35 in die Chromosomen kann nicht genau lokalisiert werden, da die Mitose bei den Cladophoraceen ja intra-

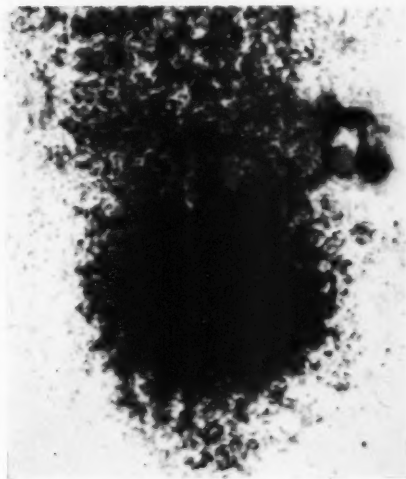


Abb. 17.



Abb. 18.

Abb. 17. *Cladophora fracta rivularis* in S-35 ( $12 \times 63$ ). Die Basalspitze eines Regenerates. Die einzelnen Silberkörner sind sichtbar.

Abb. 18. *Cladophora fracta rivularis* 5 Tage in S-35. Die Isotope werden im Plasma, in den Zellkernen und vermutlich auch in die Zellwand eingebaut.

nucleär verläuft, also nur dicht gepackte Gebilde zu sehen sind. Radioaktive Substanz wird jedoch nur in den wachsenden Zellregionen aufgenommen. Dies ändert sich während der Regeneration nicht. Erst wenn es zur Abtrennung der Rhizoidzelle kommt, findet bei der Entstehung der neuen Zellwand wieder Aufnahme und Einbau von S-35 statt.

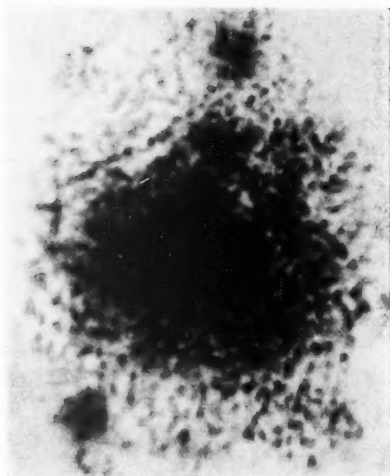


Abb. 19.



Abb. 20.

Abb. 19. *Rhizoclonium hieroglyphicum*. Die neue Zellwand ist in der Anlage des ersten Stadiums sichtbar ( $12 \times 63$ ).

Abb. 20. *Rhizoclonium hieroglyphicum*. Die neue Zellwand ist ausgebildet nach fünftägiger Kultur in S-35-haltiger Nährlösung ( $2 \mu\text{C/ml}$  Nährlösung von S-35).

Das mikroskopische Bild läßt einen klar umrissenen Schwärzungsring am Bildungsort der Zellmembran erkennen. Auch hier nehmen die nächstliegenden Zellkerne radioaktive Substanz auf. Das radioaktive Sulfation wird vermutlich in schwefelhaltige Aminosäuren aufgenommen (Zystin, Zystein, Lanthionin).

Diese Ergebnisse lassen sich mit den durch die Färbung erzielten Beobachtungen vereinbaren. Dort hat sich gezeigt, daß in unmittelbarer Nähe der Basalspitze Kerne und Nucleolen am größten sind und sich dichteres Plasma befindet. Dies legt nahe (vgl. B ü n n i n g 1953, K ü h n 1950), daß im Plasma Strukturen vorhanden sind, die die Fähigkeit der identischen Reproduktion besitzen.



## b) Einbau von P-32 und S-35 bei der Regeneration

Weiterhin ist von Interesse, wie die Regeneration abläuft, wenn die Algen dauernd in radioaktiver Nährlösung kultiviert werden und in welcher Menge die Aufnahme dieser markierten Atomarten erfolgt.

Für diese Untersuchungen diente ein Zählrohrgerät FH 41 a (Friescke und Hoepfner, Erlangen) mit zwei Glockenzählrohren für  $\beta$ -Strahler FHZ 12 (für P-32) und FHZ 15 (für S-35). Die isolierten Zellen wurden in einer gepufferten Nährlösung kultiviert, die 2  $\mu$ C/ml radioaktive Substanz enthielt. Im Abstand von je 1 Tag wurden die Algenzellen entnommen, mehrmals gründlich mit inaktiver Nährlösung gewaschen, auf einen Objektträger

Tabelle 3. Anzahl der Impulse/min für je zehn Zellen während der Regeneration in radioaktiver Nährlösung.

Zeit der Einwirkung	P-32 <i>Cl. fr. riv.</i>	P-32 <i>Rhizocl.</i>	S-35 <i>Cl. fr. riv.</i>	S-35 <i>Rhizocl.</i>
1 Tag	30	32	30	31
2 Tage	36	37	47	43
3 Tage	40	39	54	51
4 Tage	43	46	67	63
5 Tage	58	57	85	65
6 Tage	72	74	133	69
7 Tage	84	102	145	77
8 Tage	108	120	156	81
9 Tage	140	151	176	94
10 Tage	180	174	210	140

gelegt und die Impulszahl gemessen. Um mögliche Fehler auszuschalten, wurden je 25 Zellen zur Messung verwendet. Bei den Messungen wurde zunächst der Nulleffekt eliminiert, die genaue Zellzahl bestimmt und die Impulsmessungen auf 10 Zellen zum Vergleich extrapoliert. Trotz großer Vorsicht und eines relativ geringen Meßfehlers (bei je zehn Messungen eines Präparates betrugen die Abweichungen in der Zahl der Impulse stets weniger als 5%) können die Ergebnisse als nicht ganz verlässlich angesehen werden. — Obwohl diese Versuche mehrfach durchgeführt worden sind, erweist sich diese quantitative Nachweismethode des Einbaues radioaktiver Substanzen als zu grob (vgl. Tabelle 3).

Man kann lediglich insofern einen Vergleich ziehen zwischen der Zeitspanne der Einwirkung und der Zahl der Impulse, daß nach 10 Tagen eine Zunahme von etwa 6:1 erfolgt ist. Ein ähnliches Ergebnis hat Ball (1953) bei Gewebekulturen von *Daucus carota* erzielt. Außerdem ist der Anstieg nach 5 bzw. 6 Tagen wohl darauf zurückzuführen, daß das Rhizoid jetzt gebildet ist und danach eine verstärkte Aufnahme stattfindet. Weitere Schlüsse können aus diesen Ergebnissen keinesfalls gezogen werden.

## c) Nachweis durch Autoradiographie

Um ermitteln zu können, wie die markierten radioaktiven Ionen während der ganzen Regenerationsperiode in die Zelle eingebaut werden, habe

ich Präparate angefertigt von Zellen, die dauernd in radioaktiver Nährlösung kultiviert sind. Die spezifische Aktivität ist  $2 \mu\text{C}/\text{ml}$ . Die Präparate werden in derselben Weise hergestellt, wie in 8a) beschrieben ist. Es zeigt sich hier zunächst nichts grundsätzlich anderes gegenüber dem vorher Mitgeteilten, wenigstens in den ersten Tagen. Als neues Ergebnis kommt jedoch hinzu, daß im oberen Teil der regenerierenden Zelle überhaupt kein Einbau

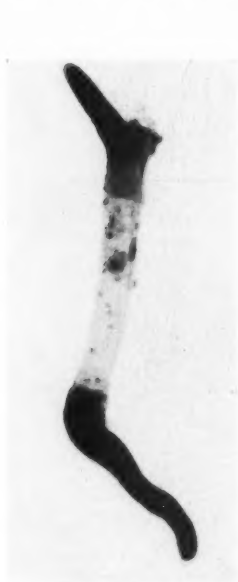


Abb. 21.



Abb. 22.



Abb. 23.

Abb. 21. *Cladophora fracta rivularis*. Das 5 Tage alte Regenerat zeigt stärkeres Wachstum an der Basis, aber auch das apikale Wachstum ist ausgeprägt.

Abb. 22. *Cladophora crispata*. 5 Tage altes zweizelliges Regenerat in S-35 kultiviert. Die Autoradiographie zeigt eine besonders starke Aufnahme radioaktiver Isotope im Rhizoid.

Abb. 23. *Cladophora fracta rivularis* ist 6 Tage in S-35-haltiger Nährlösung regeneriert. Nur in den wachsenden Zellteilen ist radioaktives Material aufgenommen.

radioaktiver Substanzen in der ersten Regenerationsphase erfolgt. Erst wenn die neue Zellwand gebildet wird, setzt in diesem Zellbereich neues Plasmawachstum ein, der mittlere Teil der Zelle bleibt vollkommen frei von Silberkörnern. Das gilt auch für mehrzellige Regenerate, die sich in dieser Hinsicht analog verhalten. Andererseits ist zu beobachten, daß im Gegensatz dazu auch in „ruhenden“ Zellen radioaktive Isotope aufgenommen werden, wenn sich Kernteilungen abwickeln. Ob dabei ein Ionenaustausch mit dem Nährmedium stattfindet, kann auf diese Weise nicht eindeutig bestimmt werden. Die Aufnahme tritt besonders bei S-35 klar her-

vor. Nach Abschluß der Versuchsreihen ist mir eine Arbeit von Levi (1954) zugänglich geworden, die mit der Ilford-G 5-Emulsion einen quantitativen Nachweis von  $\beta$ -Spuren auf photographischem Wege an Hefe und *Scenedesmus* ausgeführt hat. Dabei werden bis zu  $150\ \mu$  dicke Schichten verwendet (gegen  $5\ \mu$  Dicke bei der hier benützten Emulsion!), so daß jeder Atomzerfall aufgezeichnet wird. Bei Kodak NTB 2 gibt ein  $\beta$ -Teilchen 1–1,5 Körner, bei Ilford G 5 aber mindestens 10. Das bedeutet, daß man bei dieser Technik mit geringerer Aktivität auskommt, zudem werden die Zellen frisch in die Emulsion eingegossen. Obwohl dies nur eine verbesserte statistische Methode ist, liefert sie sicher bessere Ergebnisse, wohl auch im Falle der Regeneration bei *Cladophora*.

Die Aufnahme und der Einbau radioaktiver Atomarten zeigt, daß die markierten Ionen zunächst nur in den Zellabschnitten nachzuweisen sind, die sich in lebhaftem Wachstum befinden, in den anderen Teilen wird nichts aufgenommen, bis irgendeine Form des Wachstums eingeleitet wird. Doch ist in „ruhenden“ Zellen ein Einbau beobachtet worden, der aber nichts mit einem Differenzierungswachstum zu tun hat, sondern wohl den Umbau oder Neubau von Plasmabestandteilen demonstriert. Durch all diese Zusammenhänge wird deutlich, um welche komplexe Vorgänge es sich hier handelt. Man ersieht daraus, daß polare Plasmaneubildung und Plasmaanhäufung in engstem Zusammenhang mit dem polaren Wachstum stehen.

### 9. Zusammenfassung

1. Unter konstanten Außenbedingungen (Licht, Temperatur, Nährlösung) und an Hand einer neuen Fixierungs- und Färbemethode wird der Verlauf der Regeneration bei verschiedenen Arten von *Cladophora* studiert.

2. Unmittelbar nach der Isolierung läßt sich durch Färbung und Plasmolyse die Polarität der Zelle aufzeigen. Das Kernwachstum ist je nach Art 20–50 Stunden sistiert, während basal eine deutliche Plasmaneubildung einsetzt. Nachfolgend sind an der Zellbasis vermehrte Kernteilungen zu beobachten, die zu einer Kernanhäufung führen. Die basalen Kerne werden stärker färbbar, ebenso das Plasma, das Nucleolusvolumen nimmt zum Kernvolumen relativ zu. In einiger Entfernung vom apikalen Pol ist eine größere Anzahl Plastiden festzustellen. Der sogenannte „Chromatophor“ besteht bei den untersuchten Arten aus einzelnen Chloroplasten, die aber, dicht gelagert, meist den Eindruck eines einheitlichen Gebildes erwecken. Bei der Rhizoidbildung wie bei der Schwärmerbildung werden die einzelnen Chloroplasten sichtbar. Die Ausbildung der Rhizoidzelle dauert je nach Art 4–8–10 Tage. Die Regenerationszeit ist ebenfalls vom physiologischen Zustand der Zelle bei der Isolation abhängig.

3. Bei regenerierenden Zellen ist nach 2 Tagen an der Basalspitze ein negativer Plasmolyseort festzustellen, wodurch die feste Verbindung zwischen Zellwand und Protoplast verdeutlicht wird.

4. Dichtemessungen am lebenden und fixierten Protoplasten lassen während der Regeneration eine basale Plasmaanhäufung erkennen. Das ist auch

an der Stelle zu beobachten, an der später die neue Zellwand entsteht, die das Rhizoid abgliedert.

5. Durch Fluorochromierung mit einem Akridinorange-Auramin-Gemisch (2:1) in einer Konzentration von 1:100.000 lassen sich die an fixierten Zellen gefundenen Ergebnisse bestätigen. Eine Vitalfärbung und Kultur der Regenerate in der Farblösung ist nicht gelungen. Die Fluorochromierung wirkt auf die Zelle schädigend.

6. Die Färbung mit Berberinsulfat ermöglicht den Nachweis der Chondriosomenhäufung am basalen Zellende wenige Stunden nach der Zellisolierung. Die Färbung mit Nilblausulfat zeigt vermehrte Sphärosomenfluoreszenz an den basalen Längswänden in der Wachstumsregion.

7. In wachsenden Teilen der Zelle liegt der Entladungspunkt (IEP<sub>M</sub>) höher als bei den „ruhenden“ Zellelementen.

8. Die Nuclealreaktion mit Phenylfluoron verdeutlicht, daß in wachsenden Zellregionen mehr RNS und DNS vorhanden sind. Es liegt nahe anzunehmen, daß RNS zunächst im Plasma selbst gebildet wird, aber auch während der Mitose vom Kern ins Plasma abgegeben wird. DNS findet sich stets nur im Kern, im wachsenden mehr als im ruhenden.

9. Die Färbung mit Methylenblau-Trypaflavin zeigt eine Häufung von Metaphosphaten in der Nähe von Chloroplastenansammlungen, während die Zellpole völlig frei davon sind, dort also wahrscheinlich ein Verbrauch stattfindet.

10. Die Reaktion mit Fuchsin nach Hydrolyse zeigt eine Häufung von sogenannten Nucleotiden (einfache Nucleinsäuren) an den basalen (auch apikalen) Zellpolen im ersten Stadium der Regeneration, ehe vermehrte Kernteilungen einsetzen.

11. Die Versuche mit den radioaktiven Atomarten P-32 und S-35 bestätigen, daß eine Neubildung protoplasmatischer Substanzen in unmittelbarer Nähe der Zellpole nach der Isolierung einsetzt. Der apikale Zellteil nimmt keine radioaktiven Ionen auf, bis die Regeneration abgeschlossen ist und das Apikalwachstum einsetzt. Dies ist auch weitgehend der Fall, wenn radioaktive Isotope während der ganzen Regenerationszeit geboten werden, nur ein geringer Austausch ist zu verzeichnen. Wenn die Zellwand gebildet wird, werden radioaktive Ionen an der betreffenden Stelle in das Plasma eingebaut. In die „ruhenden“ Zellen werden ebenfalls P-32 und S-35 aufgenommen, jedoch in weit geringerem Maße als bei den wachsenden Zellen. P-32 ist zuerst an der Zellbasis nachzuweisen, von wo aus das Zellwachstum bei der Regeneration stimuliert wird. S-35 wird sofort in einem größeren Bereich der Zellspitze aufgenommen.

Herrn Prof. Dr. E. Bünning danke ich für die Anregung zu diesen Untersuchungen und für die großzügige Förderung der Arbeit. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft stellte eine Reihe von Apparaten zur Verfügung, auch dafür sei an dieser Stelle gedankt.

#### Literatur

- Ball, E., 1953: Studies of the Accumulation of certain Radioisotopes by a Callus Culture. Amer. J. Bot. 40, 306.

- Beitz, A., 1955: Untersuchungen über das Verhalten und die Wirkung der Vitalfarbstoffe Prune pure und Akridinorange. *Planta* 41, 323.
- Bogen, H. J., 1955: Anfärbung, Schädigung und Tötung von Hefezellen durch Akridinorange. *Arch. Mikrobiol.* 18, 170.
- und M. Kesser, 1954: Eiweißabbau durch Akridinorange bei Hefezellen. *Phys. Plant.* 7, 446.
- Bruyn, P. P. H. de, et al., 1955: In vivo and in vitro affinity to Diaminoacridines for Nucleoproteins. *Exper. Cell Res.* 4, 174.
- Brand, F., 1901: Über einige Verhältnisse des Baues und Wachstums von *Cladophora*. *Beih. Bot. Zbl.* 10, 481.
- Brachet, J., 1950: The localisation and the role of ribonucleic acid in the cell. *Ann. New York Acad. Sci.* 50, 861.
- Bünning, E., 1955: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze. Berlin.
- 1951: Über die Differenzierungsvorgänge in der Cruciferenwurzel. *Planta* 59, 126.
- 1952: Morphogenesis in plants. *Surv. Biol. Progr.* II N.Y.
- 1954: Regeneration bei Pflanzen. *Hdb. allg. Pathologie* VI/1.
- und F. Biegert, 1955: Die Bildung der Spaltöffnungsinitialen bei *Allium cepa*. *Z. Bot.* 41, 17.
- G. Hunck und H. Lutz: Im Druck.
- Caspersson, T. O., 1950: Cell Growth and Function.
- Carter, N., 1919: Die Cytologie der Cladophoraceen. *Ann. Bot.* 33, 467.
- Czaja, A. Th., 1950: Zellphysiologische Untersuchungen an *Cladophora glomerata*. *Protoplasma* 11, 601.
- Drawert, H., 1955: Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Janusgrün, Nilblausulfat und Berberinsulfat. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 66, 134.
- Frey-Wyssling, A., 1953: Submicroscopic Morphology of Protoplasm.
- Geitler, L., 1956: Vergleichende Untersuchungen über den feineren Kern- und Chromosomenbau der Cladophoraceen. *Planta* 25, 550.
- Guilliermond, A., 1941: The Cytoplasm of the Plant Cell.
- Haurowitz, F., and F. Crampton, 1952: The role of the Nucleus in Protein Synthesis. *Exper. Cell Res.* 2, 45.
- Heitz, E., 1925: Das Verhalten von Kern und Chloroplasten bei der Regeneration. *Z. Zellforsch. usw.* 2, 69.
- Howard, A., and S. R. Pelc, 1952: Nuclear incorporation of P-32 as demonstrated by autoradiographs. *Exper. Cell Res.* 2, 178.
- Jacobson, W., and M. Well, 1952: Nucleoproteine und Zellteilung. *Endeavour* 11, 200.
- Kühn, A., 1950: Grundriß der Vererbungslehre.
- Küster, E., 1955: Zytomorphologische Betrachtungen über Regeneration. *Ber. oberhess. Ges. Naturw. u. Heilkd., Nw. Abt.* 25, 25.
- Lanz, L., 1940: Über die Zellteilung bei *Cladophora*. *Planta* 51, 222.
- 1942: Über Protoplasma und Vakuolen der *Cladophora*-Zelle. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 60, 37.
- Levi, H., 1954: Quantitative  $\beta$ -Track Autoradiography of single Cells. *Exper. Cell Res.* 7, 44.
- List, H., 1950: Die Entwicklungsgeschichte von *Cladophora glomerata* Kuetz. *Arch. Protistenk.* 71, 455.
- Meyer, D. E., 1955: Über das Verhalten einzelner isolierter Prothalliumzellen und dessen Bedeutung für die Korrelation und Regeneration. *Planta* 41, 642.
- Miehe, H., 1905: Wachstum, Regeneration und Polarität isolierter Zellen. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 23, 257.
- Protoplasma, Bd. XLVII/1—2

- Mohl, H. v., 1845: Vermischte Schriften botanischen Inhalts.
- Moser, L., 1942: Zellphysiologische Untersuchungen an *Cladophora fracta*. Öst. bot. Z. 91, 152.
- Morthland, F. W., et al., 1954: Spectrophotometric Studies on the interaction of nucleic acids with Aminoacridines and other basic dyes. Exper. Cell Res. 7, 201.
- Müller-Stoll, W. R., 1952: Über die Regeneration und Polarität bei *Enteromorpha*. Flora 159, 148.
- Oltmanns, F., 1923: Morphologie und Biologie der Algen.
- Pringsheim, N., 1854: Grundlinien einer Theorie der Pflanzenzelle.
- Pelc, S. R., and A. Howard, 1952: Chromosome metabolism as shown by autoradiographs. Exper. Cell Res., Suppl. 2, 269.
- Perner, E. S., 1952: Die Vitalfärbung mit Berberinsulfat und ihre ... Ber. dtsh. bot. Ges. 65, 52.
- Peterschilka, F., 1924: Über die Kernteilung und Vielkernigkeit bei *Rhizoclonium hieroglyphicum*. Arch. Protistenk. 47, 325.
- Preuner, R., und J. v. Prittwitz u. Gaffron, 1952: Über den Nachweis von Reduktionsorten in Bazillen und Bakterien und ihren Zusammenhang mit den sogenannten Nucleotiden. Naturw. 39, 128.
- Schussnig, G., 1925: Die Kernteilung bei *Cladophora glomerata*. Öst. bot. Z. 72, 199.
- Schwantes, H. O., 1952: Färbanalytische Untersuchungen zur Lage des isoelektrischen Punktes. Protoplasma 41, 382.
- Sharp-Jaretsky, 1951: Einführung in die Zytologie.
- Stich, H., 1951: Experimentelle karyologische und zytochemische Untersuchungen an *Acetabularia mediterranea*. Z. Naturf. 6 b, 319.
- Stockinger, L., 1953: Das Kernkörperchen. Protoplasma 42, 365.
- 1953: Die Vitalfärbung von Gewebekulturen mit Akridinorange. Z. mikrosk.-anat. Forsch. 59, 304.
- Strügger, S., 1947: Die Vitalfluorochromierung des Protoplasmas. Naturw. 26, 267.
- 1949: Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie.
- Strasburger, E., 1888: Über Zellbildung und Zellteilung im Pflanzenreich.
- Taylor, J. H., 1953: Autoradiographic detection of incorporation of P-32. Exper. Cell Res. 4, 164.
- Tischler, G., 1954: Allgemeine Pflanzenkaryologie.
- Turchini, I., et al., 1945: Application d'une réaction nucléaire nouvelle à l'étude de divers noyaux des cellules végétales. C. r. Soc. biol. 96, 584.
- Uspenskij, E. E., und W. J. Uspenskaja, 1925: Reinkultur des *Volvox minor* und *Volvox globator* in einer synthetischen Nährlösung. Z. Bot. 22, 273.
- Windisch, F., et al., 1953: Über den Nachweis der Zellphosphate. Protoplasma 42, 546.
- Zepf, E., 1952: Über die Differenzierung des *Sphagnum*-Blattes. Z. Bot. 40, 87.
- Ziegenspeck, H. u. H., 1952: Über den Aufbau der Wandungen von *Cladophora*. Protoplasma 41, 15.
- Zimmermann, W., 1923: Untersuchungen an *Sphacelaria fusca*. Z. Bot. 15, 113.



# Le corps paranucléaire des gamètes géants d'*Allomyces javanicus* traité à l'acide borique

Par

Gilbert Turian

Institut de Botanique générale, Université de Genève

Avec 2 figures

(Reçu le 12 octobre 1955)

Le corps paranucléaire (« nuclear cap » de Hatch 1935, 1938) des cellules mobiles des *Allomyces*, volumineuse formation cytoplasmique basophile, caractérise aussi les gamètes et zoospores des autres genres de Blastocladias : *Blastocladia* (Thaxter 1896 ; Barrett 1912), *Blastocladiella* (Matthews 1937 ; Harder et Sörgel 1938), *Sphaerocladia* (Stüben 1939). Un corps basophile homologue a été signalé aussi dans les zoospores de quelques Chytridiales dont *Rhizophyidium chitinophilus* (Antikajian 1947).

L'intense affinité du corps paranucléaire d'*Allomyces javanicus* Kniep pour les colorants basiques (bleu de toluidine, pyronine, etc.) et la perte de cette basophilie après hydrolyse perchlorique ou enzymatique (test de la ribonucléase) nous ont conduit à considérer cet organite comme une accumulation transitoire d'acide ribonucléique cytoplasmique (Turian 1955). Cet acide ribonucléique est associé à des protéines sulfhydrilées, ainsi que vient de nous le révéler la teinte rose que prend le corps paranucléaire soumis à la réaction du nitroprussiate selon Rapkine, après fixation à l'acide trichloracétique. Le corps paranucléaire d'*Allomyces*, masse basophile de ribonucléoprotéine sulfhydrilée, présente donc les caractères chimiques de l'ergastoplasme des cellules animales (voir Brachet 1944). L'étude micromorphologique, au microscope électronique, permettra<sup>1</sup> de préciser s'il en a la structure lamellaire (voir Frey-Wyssling 1955) et s'il enrobe dans sa substance des éléments du chondriome (chondriosomes vésiculisés), comme le prétendait Hatch (1935).

<sup>1</sup> L'obtention de coupes ultra-minces de gamètes d'*Allomyces* et leur observation au microscope électronique viennent de confirmer notre opinion (Turian, 1955) que le corps paranucléaire, de structure apparemment granulaire, est bien distinct et entouré des mitochondries (G. Turian et E. Kellenberger, Exptl. Cell Research, 1956).

Fait notable, le corps paranucléaire d'*Allomyces* n'est bien visible, autour du noyau des gamètes, que jusqu'à la fusion nucléaire dans les zygotes. Il est ensuite rapidement résorbé (chute de la basophilie périnucléaire) lors de la reprise de l'activité mitotique accompagnant la germination des zygotes.

Les premiers amas basophiles, générateurs des corps paranucléaires, apparaissent au stade du clivage du contenu des gamétanges d'*Allomyces javanicus*. Ces amas confluent et forment des masses chromophiles, séparées

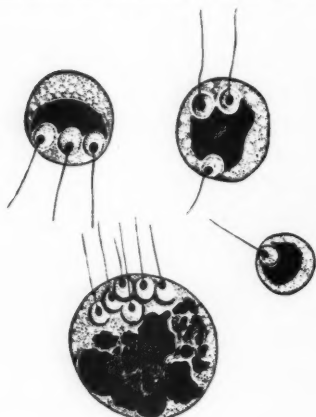


Fig. 1.

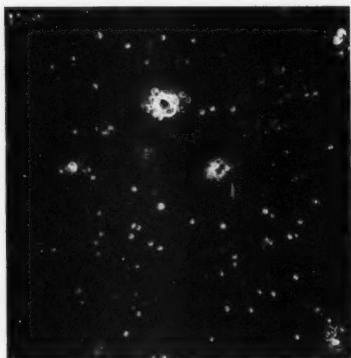


Fig. 2.

Fig. 1. 3 gamètes femelles géants et un normal (à droite) d'*Allomyces javanicus* Knip traité à l'acide borique M/20. Fixateur de Schaudinn (selon Hatch), 20—30 minutes; coloration hématoxyline ferrique (selon Regaud).

Fig. 2. Suspension de gamètes d'*A. javanicus* dans l'acide borique M/100 (tampon phosphate neutre). Remarquer deux gamètes femelles géants auréolés de gamètes mâles. Photo contraste de phase Leitz (gross. environ 200X).

par les sillons de clivage en progression centrifuge. Ce processus aboutit à la distribution d'un seul corps paranucléaire par gamète. Mais, comme Hatch (1935) l'a déjà signalé chez *Allomyces arbusculus* Butl., la bonne marche du mécanisme de clivage peut être perturbée pour des raisons inconnues et conduire à la formation occasionnelle de gamètes anormaux frappés de gigantisme.

Nous avons trouvé que ce gigantisme gamétique peut être provoqué par simple immersion des gamétanges d'*Allomyces*, avant le clivage de leur contenu, dans une solution tamponnée (solution phosphates neutre) d'acide borique M/20 à M/400. En présence de  $H_3BO_3$  M/20, la majorité des gamètes libérés, tant mâles que femelles, sont plurivalents, c.-à-d. bi-, tri- ou plurinucléés (voir fig. 1). De grosses sphères pluriciliées et peu mobiles, contiennent jusqu'à 10 noyaux groupés à l'un de leurs pôles. Fait intéressant, le corps paranucléaire des gamètes bi- ou trinucélés ne forme qu'une masse régulière emboîtant les noyaux. Par contre, dans les gamètes géants pluri-

nucléés (plus de 3 noyaux), on peut observer, à l'opposé du groupe nucléaire, un amas volumineux et irrégulier de blocs et de sphères basophiles (voir fig. 1). Dans la solution tampon-phosphates témoin, la grande majorité des gamètes libérés sont normaux (mononucléés et monociliés).

Sur le plan physiologique, nous avons observé que les petits gamètes mâles normaux (ayant échappé à l'action inhibitrice de l'acide borique) manifestent un chimiotactisme positif exalté à l'égard des gamètes femelles géants (fig. 2). Il y a là un exemple de plurivalence sexuelle concernant l'émission de substances attractives (gamones) par les gamètes femelles d'*Allomyces*.

En résumé, l'acide borique, dont nous avons montré les propriétés anti-copulantes vis-à-vis des gamètes libres d'*Allomyces* (Turian 1954), aux concentrations M/2 à M/40 surtout, interfère aussi avec le clivage normal (cytokinèse) du cytoplasme gamétangial chez ce Champignon, spécialement aux concentrations M/20 à M/400. Cette action inhibitrice se porte surtout au niveau des masses basophiles paranucléaires dont le découpage et l'ordonnance en un corps cytoplasmique bien défini est perturbée.

On peut se demander si l'acide borique n'interfère pas avec le métabolisme de l'acide ribonucléique, élément constitutif essentiel du corps paranucléaire, soit par inhibition de la phosphodiesterase (démonstration in vitro selon Zittle 1947), soit par formation de complexes boro-ribonucléiques (fixation du bore sur les groupes hydroxyles selon modèles de la riboflavine, des coenzymes, etc. mentionnés par Zittle 1951).

### Summary

The gametes of *Allomyces javanicus* exhibit a nuclear cap essentially made of ribonucleoprotein with sulphhydryl groups.

When dipped in phosphate buffered solutions of boric acid M/20–M/400, the male and female gametangia of *Allomyces* liberate giant male and female gametes. Such giant gametes exhibit either a single regular nuclear cap (with 2 or 3 nuclei) or a massive and irregular basophilic formation (with 4–10 nuclei).

Boric acid may interfere with ribonucleic acid, essential constituent of the nuclear cap, during the cleavage of the gamete-units in the gametangia.

### Bibliographie

- Antikajian, G., 1947: *Rhizophydium chitinophilus*. Mycologia 39, 612.  
 Barrett, J. T., 1912: The development of *Blastocladia strangulata* n. sp. Bot. Gaz. 54, 353.  
 Brachet, J., 1944: Embryologie chimique. Masson et Cie., Paris.  
 Frey-Wyssling, A., 1955: Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. Protoplasmatologia, Handbuch der Protoplasmaforschung, Springer-Verlag, Wien.

- Harder, R., und G. Sörgel, 1938: Über einen neuen planoisogamen Phycomyceten mit Generationswechsel und seine phylogenetische Bedeutung. Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, N. F. Fachgr. 6, Biol. 3, 1.
- Hatch, W. R., 1935: Gametogenesis in *Allomyces arbuscula*. Ann. Bot. 49, 625.
- 1938: Conjugation and zygote germination in *Allomyces arbuscula*. Ann. Bot., N. S. 2, 585.
- Matthews, V. D., 1937: A new genus of the *Blastocladiaceae*. J. Elisha Mitchell Sci. Soc. 53, 191.
- Rapkins, L., in D. Glick, 1949: Techniques of Histo- and Cytochemistry. Interscience Publ., Inc., New York.
- Stüben, H., 1939: Über Entwicklungsgeschichte und Ernährungsphysiologie eines neuen niederen Phycomyceten mit Generationswechsel. Planta 30, 355.
- Thaxter, R., 1896: New or peculiar aquatic fungi. 3. *Blastocladia*. Bot. Gaz. 21, 45.
- Turian, G., 1954: L'acide borique, inhibiteur de la copulation gamétique chez *Allomyces*. Exper. 10, 498.
- 1955: Sur la nature ribonucléique du corps paranucléaire et ses relations avec la différenciation du sexe chez *Allomyces*. C. r. Acad. Sci., Paris 240, 2343.
- Zittle, Ch. A., 1947: Federation Proc. 6, 500.
- 1951: Reaction of borate with substances of biological interest. Adv. in Enzymol. 12, 495.

## Elektropolare Farbstoffe im elektrischen Organ

Von

**Rudolf Keller, New York**

*(Eingegangen am 25. November 1955)*

Im Jahre 1950 wurden in der Madison Foundation for Biochemical Research, New York, Versuche zur Vitalfärbung des elektrischen Aales mit Vitalfarben begonnen. Wir waren uns wohl bewußt, daß unsere morphologischen Kenntnisse der elektrischen Fische nicht im mindesten vergleichbar waren mit denen der Spezialisten, die in diesem schwierigen Feld hervorragende Arbeiten herausbrachten. Was uns ermutigte, mit unserer Arbeit fortzufahren, war die Tatsache, daß wir gewisse mikroskopische Vitalfärbungsmethoden empirisch auf Grund von Versuchen mit Testobjekten bekannter Elektromikrostruktur ausgearbeitet hatten, die von drei oder vier unabhängigen Kontrollen verifiziert werden konnten und unseren Resultaten einen gewissen Grad von Verlässlichkeit sicherten. Insbesondere hatten wir in den letzten Jahren ein paar alte Methoden der Mineralanalyse mit Farbstoffen in halbquantitative verbessert, so daß wir hoffen durften, daß spätere Analysatoren unsere halbquantitativen Methoden mit Hilfe des Photometers zu vollquantitativen Bestimmungen ausbauen würden. Die Methoden sind beschrieben in früheren Arbeiten, z. B. Sulzberger und Mitarbeiter (1950).

Wir gehen von der alten Voraussetzung aus, daß die Tracer-Methoden von v. Hevesi unter Umständen auch auf Nichtisotope ausgedehnt werden können. besonders im Falle der Fluoreszenz-Vitalfarbstoffe, die in Verdünnungen von Hunderttausenden noch kolorimetrisch geschätzt werden können, so daß man die beiden gegensätzlich gerichteten Stoffbewegungen im lebenden Objekt beobachten kann. Die unsichtbaren Zirkulationen sind die der extrazellulären, positiv geladenen Gruppe von Wasser, Natrium- und Lithiumsalzen, die Chloride, Jodide, Thiocyanate sowie ferner die intracelluläre Gruppe von Kalium, Magnesium, Sulfaten, Phosphaten. In diesen Gruppen sind Basen- und Säure-Radikale miteinander vermischt, so, als ob vom gewöhnlichen Protoplasma Säuren von Basen nicht unterschieden werden können. Das lebende Cytoplasma scheint außerhalb der Chemorezeptoren keinen Geschmacksinn zu haben, sondern unterscheidet zwischen den Substanzen lediglich nach ihrem Platz in den lyophilen Serien von Hofmeister und Spiro, die nach Hoerber (1905) von elektrischen Kräften mitbestimmt werden.

Wenn wir Natrium im Cytoplasma festzustellen versuchen, so verwenden wir beispielsweise Uranin, Natriumfluoresceinat, ein nichtradioaktives Natriumsalz, das

den Vorteil hat, in einer Verdünnung von 100.000 und mehr noch mit dem Photometer geschätzt werden zu können. Da laut v. Hevesy's Entdeckung alle Natriumsalze im lebenden Organismus den gleichen Weg gehen, so sind wir mit dem Fluoreszenzmikroskop in der Lage, die Natriumströme, die im gewöhnlichen Licht farblos und unsichtbar sind, während ihrer Bewegung zu beobachten und zu photographieren. Uranin ist eines unserer schlechtesten Reagenzien, da es nur große Anhäufungen von Natrium sichtbar macht. Säurefuchsin in saurer Lösung ist für kleine Mengen von Natrium besser.

Der Autor ist sich der Unzulänglichkeit seines Wissens auf vielen Spezialgebieten wohl bewußt und unterstreicht sie fortwährend. Es ist nicht anders möglich bei Versuchen mit neuen Methoden der Vitalfärbung, die an den verschiedensten Organen der verschiedensten Tiere und Pflanzen ausprobiert werden müssen. Auf der anderen Seite hat die winzige Minorität der Biologen, die meine Methoden überhaupt als annehmbar betrachteten, mich anläßlich meines 80. Geburtstages in der Spezialnummer der „Experimental Medicine and Surgery“ mit unverdientem Lob überschüttet. Die Wahrheit liegt wahrscheinlich nahe der Mitte.

Wir haben 1950 und 1951 etwa 60 supravitale Färbungen an möglichst frischen Schnitten des elektrischen Organs untersucht, später auch ein paar zentimeterdicke Schnitte in Farbstofflösungen deponiert und am Gefriermikrotom in dünne Schnitte zerlegt. Mit beiden Verfahren erschien das gleiche Resultat: Muskeln positiv, Körperflüssigkeiten negativ. Mit Thioflavin, Vasoflavin, mit einem Gemisch gleicher Teile 1:20.000 Methylenblau und Uranin, in Ringer- oder isotonischer Glukoselösung waren die elektrischen Organe im Fluoreszenzlicht gelbgrün, die Muskeln blau, das Serum gelbgrün.

Als Kontrollen wurden Indikatorfärbungen benutzt, die immer die elektrischen Organe in der Basenfarbe färbten, die Muskeln dagegen in einer schwachen Säurefarbe und niemals in der Basenfarbe. Besonders klar tingierten sich die Indikatoren für Oxydation, reduziertes Methylenblau oder Toluidinblau, das die Muskeln — Oxydationsorte nach P. G. U n n a — blau färbte, in Verdünnungen von 1:25.000. Die elektrischen Platten dagegen reagierten niemals auf solche reduzierte Basenfarbstoffe und wurden in Silbernitrat und in Ferrisalzlösungen stark reduziert. Daß die elektrischen Organe am Galvanometer negative Ströme aussenden, ist bekannt. Nach unserer Erfahrung ist das Flammenphotometer eines der besten quantitativen Meßinstrumente für elektrostatische Ladungen an Organen und Organteilen. Die Verhältniszahl zwischen Natrium (positiv) und Kalium (biologisch negativ) ist ein verlässliches Maß für relative Positivität.

Diese Beschreibung ist naturgemäß lückenhaft. Jeder Elektrophysiologe weiß, daß es kein einfach positives oder einfach negatives Organ im lebenden Körper gibt. Demzufolge kann in dem noch so frisch erhaltenen Gewebe, sobald es seine Zirkulation eingebüßt hat — ein Zustand, der als „supravital“ bezeichnet wird —, eine schwächere Differenzierung der Nerven beobachtet werden als im Leben. Während wirklich lebende Nerven in allen von uns untersuchten höheren und niederen Tieren vitalfärberisch einen scharfen Gegensatz aufwiesen zwischen den positiven Nervaxonen und den negativen Nervenscheiden und den ebenfalls negativen Körperflüssigkeiten, war dieser Kontrast in den frischen Stücken des vor etwa



$\frac{1}{4}$  Stunden getöteten Tieres nur mehr schwach zu erkennen, beispielsweise daran, daß die Nervenscheiden sich nicht gefärbt hatten, die Axone jedoch schwach blau erschienen.

1955 erschien ein Aufsatz von K. Nishie und E. J. Harris (Cambridge) über die Elektrolyte des elektrischen Organs von *Electrophorus*; sie hatten mit dem Flammenphotometer im Sachsschen Organ einen Na/K-Koeffizienten von 6:1 entdeckt, der alles übertraf, was bisher in einem festen tierisch-protoplasmatischen Gewebe beobachtet werden konnte. Uns war die Schilddrüse, in der wir ein 2:1-Verhältnis zugunsten des Natriums gravimetrisch bestimmt hatten, als das negativste Organ des Körpers erschienen. Nach dieser Veröffentlichung des biophysikalischen Laboratoriums von Rio de Janeiro ist dagegen das Sachssche Organ das negativste von allen festen Organen. Die beiden zitierten Autoren haben sich für den Na/K-Index nur wenig interessiert, aber die sehr wichtigen Grundlagen der Mineralverteilung und ebenfalls einen sehr großen Chlorgehalt mitgeteilt. Sie haben keine Hypothesen aufgestellt und wie die überwältigende Mehrheit der Physiologen nie davon gehört, daß man mit Uranin große Natriumanhäufungen im Organismus schätzen kann. Dies ist teilweise unser eigenes Versäumnis, da wir es unterlassen hatten, ausführliche Mitteilungen zu veröffentlichen. Wir sind überzeugt, daß sich das Verhältnis Na/K im Sachsschen Organ noch erhöhen lassen wird, wenn man es mit der Uraninmethode (die nicht die beste ist) oder mit einer besseren Farbstoffmethode feststellt und dann die natriumreichen Strukturen mit einem Mikromanipulator von den übrigen mehr intracellularen Zellen abtrennt; bei diesem Verfahren wird man sehr wahrscheinlich einen Natriumüberschuß von 10:1 und sogar mehr finden. Die feine elektrische und chemische Differenzierung des lebenden Cytoplasmas kann durch verfeinerte Untersuchungsmethoden nur an Klarheit gewinnen.

In diesem Zusammenhang ist es notwendig, auf weiter zurückliegende Arbeiten zurückzugreifen, die aber heute noch für das Thema der elektrischen Fische von Interesse sind. Im Jahre 1930 hat Bruno Kisch eine Arbeit über „Harnstoffuntersuchungen bei Selachiern“ veröffentlicht, die bemerkenswerte Ziffern über den Harnstoff der elektrischen Fische enthält. Es war zu erwarten, daß der Harnstoff, der stark negativ ist, im elektrischen Organ besonders niedrig sein würde. Kisch fand erstaunlicherweise im elektrischen Organ doppelt soviel Harnstoff als im Muskel. Es ist offenbar so, daß im elektrischen Organ besonders hohe Voltladungen vorkommen und daß ein höherer Prozentsatz von Harnstoff ebenfalls vorherrscht.

Es ist das große Verdienst von Nishie und Harris, sich der mühevollen Aufgabe unterzogen zu haben, die Elektrolyte des elektrischen Organs zu studieren. Es war eine originelle und fruchtbringende Idee, auf die nicht so leicht jemand verfiel. Zudem haben beide Autoren ein umfassendes Wissen über die Morphologie des elektrischen Organs, das mir fehlt, der ich fast alles, was ich in dieser Hinsicht vom elektrischen Fisch weiß, Professor David Nachmannsohn vom College of Physicians and Surgeons der Columbia University und dessen Mitarbeitern verdanke, die mir ein paar Hinweise über Anatomie und Histologie der *Electrophorus* gegeben haben.

Es war mir interessant zu erfahren, welche Ladungen das elektrische Organ hat und ob es einen sogenannten Ruhestrom nachweisen läßt. Wir haben in New York das Glück, im Laboratorium der Columbia-Universität außer dessen Leiter, Professor Nachmannsohn, auch Professor Erwin

Wilson, Dr. Altamirano und andere genaue Kenner des Problems zu kennen. Ich ersuchte Professor Nachmannsohn, mir ein paar Teile des frischen Fisches *Electrophorus*, des elektrischen Aals, zu überlassen. Er gab mir nicht nur die erbetenen Teile zur Analyse mit Vitalfarbstoffen, sondern erbot sich später, mir ganze lebende Fische zu überlassen, um den Stoffwechsel dieser merkwürdigen Tiere im Normalzustand zu untersuchen. Zu meinem Bedauern konnte ich den generösen Vorschlag des bekannten Biochemikers, der eine Autorität auf diesem Gebiet ist und selber elektrische Organe vital mit Tageslichtfarbstoffen gefärbt hat, nicht annehmen, da die Madison Foundation Tiere von der Größe dieser Fische wegen Mangels an Platz und Personal nicht untersuchen konnte.

Die ersten Versuche und die Angaben der Literatur machten es aber klar, daß wir in dem elektrischen Organ Strukturen mit den stärksten bisher bekannten Kathoden vor uns hatten. Mit allen Säureindikatoren wurden sie sofort farblos oder basenfarben, mit Reduktionsmitteln wie Osmiumsäure wurden sie schwarz, und sie reduzierten Ferrisalze. Nach unseren Analysen anderer Organe und Säfte war es bald klar, daß wir eine der stärksten Natriumkonzentrationen vor uns hatten, die uns in den verschiedensten Tier- und Pflanzenorganen je vorgekommen sind.

Dieser Eindruck wurde womöglich noch verstärkt, wenn wir die Stücke mit Ultraviolettfarbstoffen behandelten. In den diphasischen Farbstoffen leuchteten die Platten der elektrischen Organe mit einer sonst selten beobachteten Helligkeit auf. Das war um so merkwürdiger, als die Präparate seit mindestens  $\frac{3}{4}$  Stunden tot waren. Es gibt Gewebe, die ihre Elektropolarität nach dem Tod stark ändern; zu diesen scheint der elektrische Fisch nicht zu gehören. Die Muskeln oder Nerven oder Hautstücke der in Eis gepackten und im Kühlschrank aufbewahrten Organe färbten sich wie lebende Muskeln, Nerven und Haut, nur etwas schwächer. Dieser Umstand machte es sehr wahrscheinlich, wenn nicht ganz sicher, daß wir sehr negative und natronreiche Organe vor uns hatten. Nach dieser Zeit haben wir die Versuche an elektrischen Fischen für ein paar Jahre abbrechen müssen.

Im letzten Jahr — 1955 — fielen mir ein paar alte mikroskopische Präparate des elektrischen Organs von *Electrophorus* in die Hand, die sich merkwürdig gut gehalten hatten. Inzwischen hatten wir zusammen mit Dr. Harry Sobotka und Frau Dr. A. V. Luisada-Opper einige Hypophysen und eine Schilddrüse von Schlachttieren untersucht und mit dem Flammenphotometer des New-Yorker Mount Sinai Hospitals große Natriumgehalte in allen Teilen dieser Organe festgestellt (*Nature* 173, 585, 1954). Im Herbst 1955 war es klar, daß wir im elektrischen Organ das ideale Natrium akkumulierende Organ vor uns hatten, warteten jedoch mit der Veröffentlichung, bis wir mehr Kontrollen gemacht hatten. Es erschien fast sicher, daß kein anderer Experimentator uns mit diesen Analysen zuvor kommen würde. Ganz unerwartet erschien dann in der Aprilnummer des „J. f. cellular and comparat. Physiol.“ die schon erwähnte Arbeit von Keica Nishie und E. J. Harris, die im Sachsschen Organ, dem negativsten Teil elektrischer Platten, ein Na/K-Verhältnis von 6:1 gefunden hatten, einen

relativen Reichtum an Natrium, wie die ältesten Spezialisten in Alkalisalzanalysen ihn bisher in keinem festen Organ festgestellt haben. In der Literatur gibt es nur einen einzigen Befund, der diesem Verhältnis nahekommt, nämlich die Analysen von Thaddeus Mann in Cambridge in seiner Monographie über die Alkalien des Samens (1954). Mann fand in den natronreichsten Spermatozoen des Stieres viermal soviel Na als K. Das war schon sehr viel und höher als alle anderen Verhältniszahlen in festen Geweben. Die Forscher der Jahrhundertwende, Klassiker, wie Miescher, Schmiedeberg und K. Spiro, hatten mit den damaligen Methoden nicht eine Spur von Kalium im Sperma gefunden.

Die beiden Untersucher Nishie und Harris sind offenbar Fachleute in der Anatomie und Histologie der elektrischen Fische; es war ihre Vermutung, daß das Sachs-Organ den größten Natriumgehalt haben müsse, und das Flammenphotometer bestätigte ihre Vermutung. Auf der anderen Seite teilen sie einige Irrtümer mit der großen Majorität der Biochemiker, nämlich die Voraussetzung, daß die Kalisalze im Protoplasma Kationen sind, während sie sich bewußt waren, daß Kalisalze im lebenden Körper immer und überall entgegengesetzt den Natronsalzen wandern. Nicht einmal die Natronsalze, die tatsächlich innerhalb und außerhalb des Protoplasmas eine positive Oberfläche zeigen, sind wirkliche Kationen. Der Biochemiker der Universität Istanbul, Z. S. Sary, früher Professor der Biochemie an der deutschen Universität in Prag, berichtete 1927, daß er unter der Hochspannung von 1000 Volt und der Stromstärke von wenigen Milliampere per Quadratzentimeter im anorganischen Laboratorium, aber unter der Spannung und Stromstärke der lebenden Zellen, das Kochsalz zusammen mit der Hauptmasse des Chlors, d. i. ähnlich wie in einem Molekül an der negativen Elektrode beobachtete.

Die überwältigende Mehrheit der Biochemiker schreibt die meisten Lebensaktionen der Zellen, insbesondere die elektrischen, den Membranen zu nach der Theorie von Bernstein um 1900 und zusammengefaßt in seiner „Elektrobiologie“ von 1912. Bernstein war ein hervorragender Elektrophysiologe, der seiner Zeit voraus war und als erster mit Experimenten bewiesen hat, daß die Pflanzen ihre Säfte, wie wir es heute nennen, „elektrophoretisch“ bewegen. Seine Membrantheorie hingegen war ein Irrtum. Eine kleine, aber tapfere Schar von Physiologen unter Rafael Lorente de Nó bekämpft die Membrantheorie, findet aber in den Lehrbüchern des Westens keine Erwähnung. Wie ich wiederholt im „Protoplasma“ gepredigt habe, ist es vollkommen unrichtig, der Zellmembran, die keine Reserven an Kohlehydraten, Fetten, Mitochondrien hat, große Energieleistungen zuzuschreiben. Die Stoffbewegung zwischen den Zellen wird mindestens zu 99% vom Cytoplasma hinter den Zellmembranen durch Coulombkräfte der Anziehung und Abstoßung verursacht und nicht von Kräften innerhalb der Membranen.

Solange diese Tatsache nicht in die Lehrbücher und die Vorlesungen der Universitäten aufgenommen wird, werden die phantastischen und veralteten Hypothesen den Fortschritt der experimentellen Methodik verhindern. Mein mehr als fünfzigjähriges Studium neuer mikroskopischer Methoden hat mich ferner davon überzeugt, daß die ausschließliche Beschäftigung mit der Tageslichtmikroskopie unter Vernachlässigung der Fluoreszenzmikroskopie, die in Amerika schlimmer ist als in Europa, die unsichtbaren Zirkulationen des farblosen Gewebswassers vielen Forschern verborgen bleiben läßt, da diese im Tageslichtmikroskop nicht beobachtet werden können. Der Urologe Felix Fuchs pflegt zu sagen, daß die Bio-

logen, die sich ausschließlich auf Weißlichtmikroskopie beschränken, farbenblind sind für alle Wellenlängen unter 4000 Å.

#### Literatur

- Bernstein, T., 1912: Elektrobiologie. Vieweg, Braunschweig.  
Keller, R., A. V. Luisada-Opper und H. Sobotka, 1954: *Nature* 173, 585.  
— 1951: *Protoplasma. Sonderheft der Prager Arbeitsgemeinschaft* 13, 464.  
Kisch, B., 1930: *Biochem. Z.* 225, 197.  
Loewi, O., F. Fuchs, F. Waelsch, and H. Kaunitz, 1955: Keller-Anniversary-Issue. *Exper. Med. Surg.* 13, 1.  
Mann, T., 1954: *Electrolytes of Semen*. Methuen, London.  
Nishie, K., and Ed. Harris, 1955: *J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.)* 45, 484.  
Spiro, K., und R. Keller, 1929: *Elektrostatik in der Biochemie. Sonderheft der Prager biol.-physik. Arbeitsgemeinschaft, Kolloidchemische Beihefte.* 28, Heft 7—10, Steinkopff, Dresden.  
Stary, Z., 1927: *Z. physik. Chem.*  
Sulzberger, M. B., F. Herrmann, R. Keller, and B. V. Pisha, 1950: *J. invest. Dermat.* 14, 91.

# Gerbstoffidioblasten in der Scheide von *Carex*<sup>1</sup>

Von

Charlotte Thielke

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Dezember 1955)

Gelegentlich anderer Untersuchungen an verschiedenen *Carex*-Arten fielen in dem meist chlorophyllfreien, häutigen Teil der Scheide Zellen auf, die eine stark lichtbrechende Vakuole besitzen und nach Einwirkung verschiedener Reagenzien Gerbstoffcharakter zeigen. Diese Idioblasten sind bei vielen Arten anzutreffen. Von den untersuchten Formen sind sie gefunden worden bei: *C. acutiformis* Ehrh., *C. binervis* Sm., *C. crus corvi* Shutl., *C. lasiocarpa* Ehrh., *C. paniculata* Justen, *C. pendula* Huds., *C. punctata* Gaud., *C. reticulata* Peterm., *C. riparia* Curt., *C. stolonifera* Hoppe, *C. strigosa* Huds., *C. vulpina* L.; nicht gefunden wurden sie bei: *C. arenaria* L., *C. aristata* Sieg., *C. atherodes* Spr., *C. aurea* Nutt., *C. canescens* L., *C. cyperoides* L., *C. flacca* Schreb., *C. gmelini* Hook et Arn., *C. grayi* Carey, *C. hirta* L., *C. inflata* Huds., *C. limosa* L., *C. oederi* Retz., *C. panicea* L., *C. pseudocyperus* L., *C. vesicaria* L.

Bei allen geprüften Arten besteht dieser Teil der Scheide aus anfangs nur zwei Zellagen, von denen die innere oft etwas größere Zellen hat. In der äußeren Schicht entstehen bei vielen Arten an bestimmten Stellen durch Aufteilungen parallel zur Oberfläche Faserbündel, die die Scheide — einer lockeren Nervatur vergleichbar — durchziehen und innen und außen von je einer Zellschicht bedeckt sind. Über die Entstehung dieser Faserzellen wird an anderer Stelle berichtet werden. Von den Orten mit Fasern abgesehen, bleibt die Scheide hier zweischichtig ohne dazwischenliegende Interzellularen. Beide Seiten sind von einer Cuticula überzogen, die das Eindringen vieler Reagenzien sehr erschwert. An vitalen Geweben können diese daher oft nur von den Wundrändern aus eindringen. Die *Carex*-Scheiden sind in vieler Hinsicht recht geeignete Objekte für zellphysiologische Untersuchungen. Ihre Zellen zeigen eine lebhafteste Plasmaströmung, einen gut sichtbaren Kern und führen manchmal Stärke.

<sup>1</sup> Frau Prof. Dr. Elisabeth Schiemann zum 75. Geburtstag in Verehrung zugeeignet.

In der Außenschicht, die aus Zellen etwa gleicher Größe und gleicher Form aufgebaut ist, finden sich die Idioblasten in einer Verteilung, wie sie Abb. 3 zu entnehmen ist. Vereinzelt kommen sie auch in der Innenepidermis vor. In der Epidermis und im Mesophyll des übrigen Blattes fehlen sie sowohl auf Ober- und Unterseite als auch in Spitze und Basis; lediglich am Rande der Ligula sind sie noch vorhanden. Nach den Untersuchungen von Waldheim (1949)<sup>2</sup> sind jedoch bei mehreren *Carex*-Arten Gerbstoffzellen im Mesophyll durch Elektivfärbung mit Rhodamin B nachzuweisen. Sie kommen dort in der Nachbarschaft der Leitbündel vor. Von den hier geprüften Arten trafe das für das Mesophyll von *C. vulpina*, *C. pendula*



Abb. 1.

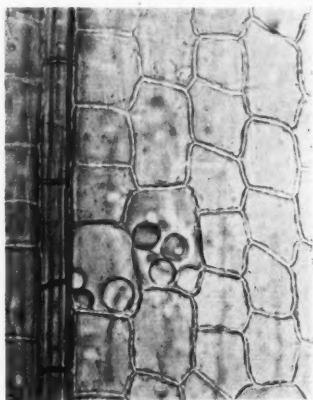


Abb. 2.

Abb. 1. Gerbstoffidioblast in der Scheide von *Carex acutiformis*.

Abb. 2. Zwei Gerbstoffidioblasten in der Scheide von *Carex crux corvi*.

und *C. flava* (s. u.) zu. Sie liegen meist einzeln, können aber auch zu zweit, seltener zu dritt in einer Reihe hintereinander angeordnet sein. In diesen Zellen befinden sich stark lichtbrechende, vermutlich sehr zähflüssige Inhaltskörper, die fast den ganzen Raum einer Vakuole einnehmen, meist aber noch kleinere, abgerundete, schwach lichtbrechende Vakuolen in sich führen, die am besten am Rande in der Nähe der Zellwand zu erkennen sind (Abb. 1 und 2).

Zur Charakterisierung dieser Inhaltskörper wurden einige orientierende Untersuchungen vorgenommen. Bei der in allen wesentlichen äußeren Eigenschaften recht weitgehenden Übereinstimmung der Idioblasten der einzelnen Arten mag es zunächst genügen, nur auf zwei genauer einzugehen. Es ist aber trotzdem zu erwarten, daß bei einer gründlicheren Prüfung eine ganze Reihe feinerer Unterschiede zutage treten.

<sup>2</sup> Herrn Prof. Dr. K. Höfler, Wien, bin ich für seinen freundlichen Hinweis sehr zu Dank verbunden. Herrn Dr. H. Kinzel, Wien, möchte ich für die Überlassung eines Sonderdruckes der Arbeit von Waldheim vielmals danken.



*Carex acutiformis* hat Scheiden mit ziemlich langgestreckten Zellen. Faserbündel sind reichlich vorhanden und spreizen am oberen Rande fiederartig auseinander. Die Idioblasten, die sich in der äußeren Form nicht von den umgebenden Zellen unterscheiden, sind in der Längsrichtung gestreckt und etwa  $14-22 \times 35-60 \mu$  groß. Der stark lichtbrechende Inhaltkörper, der fast die ganze Zelle ausfüllt, scheint im Innern homogen zu sein. Plasmaströmung ist nur an seiner Oberfläche zu beobachten. Dagegen ist an kleinen Einschlüssen im Innern der schwach lichtbrechenden Vakuolen häufig Brownsche Molekularbewegung wahrnehmbar. Alle Zellen sind von einer recht glatten Cuticula überzogen. Bei *Carex crus corvi* sind die aus ineinandergeschachtelten Blättern bestehenden Schäfte sehr dick; die häutige Scheidenflanke ist dadurch besonders gut zu präparieren. Faserbündel sind hier oft etwas spärlicher vorhanden und liegen parallel zueinander. Die übrigen Zellen haben anfangs auf der Außenseite auch eine längsgestreckte Form, dehnen sich aber anscheinend später in der Querrichtung, dadurch werden sie z. T. quadratisch (Abb. 2). Wahrscheinlich erfolgt hier die Querstreckung erst zu einem Zeitpunkt, zu dem die Cuticula schon weitgehend fertig ausgebildet ist; denn an älteren Scheiden sind kleinere Längsrisse und Schuppenbildung als Folgen einer solchen Dehnung zu erkennen. Liegen in der Mitte dieser Scheidenhaut die Faserbündel dichter beieinander, dann sind meist keine Cuticularrisse nachweisbar. Diese Unterschiede in der Beschaffenheit der Scheiden machen sich bei Anwendung von Reagenzien bemerkbar. Bei *C. crus corvi* sind die Cuticula und vielleicht auch die Zellwand leichter durchlässig als bei *C. acutiformis*.

Die *Carex*-Scheiden führen häufig in ihren basalen Teilen Stärke; auffällig ist dabei, daß die Zellen mit stark lichtbrechenden Vakuolen praktisch immer stärkefrei sind. Die Idioblasten und speziell die festen Vakuolen färben sich mit Jodjodkali und mit Chlorzinkjod dunkel mahagonibraun. Dabei ist oft eine Vakuolisierung festzustellen, manchmal auch eine homogene Anfärbung, es kann auch beides nebeneinander in der gleichen Zelle vorkommen. In Kaliumbichromat werden die Idioblasten ebenfalls mahagonibraun bis braunschwarz. Hierbei zeigt sich die Unterschiedlichkeit der beiden Arten wieder in dem durch die Cuticula bedingten Verhalten. Bei *C. crus corvi* bilden sich, vermutlich durch Quellung der Zellwände hervorgerufen, breitere Risse innerhalb der Cuticula, die besonders lang und deutlich am oberen Scheidenrand sind. Zur Basis hin werden sie etwas feiner und stärker gekrümmt, so daß kleine Schuppen entstehen. Nach längerer Einwirkung der Lösung kommt es dann zu einem Aufbiegen und manchmal auch zur Abschülferung der Cuticula. Auffällig ist, daß über den Idioblasten diese Spalten kaum zu finden sind, nur manchmal greifen sie etwas von benachbarten Zellen aus hinüber. Hier kommt es dann nach erfolgter Verquellung zur Ablösung einer Cuticularscholle von etwa Zellengröße. *C. acutiformis* hat keine entsprechende Cuticularstruktur, und das ist wahrscheinlich der Grund, weshalb manche Reagenzien hier langsam und nur vom Rande her eindringen können.

Millonsches Reagens hat Gelbfärbung und Schrumpfung des Inhaltes zur Folge. Eisensalze färben ihn braunschwarz, niemals grün oder blau. Mit Dimethyl-*p*-aminobenzaldehyd gibt es eine Rotfärbung des Idioblasten-inhaltes, ein Zeichen dafür, daß es sich um einen Phloroglucinabkömmling handeln muß. Unter Einwirkung von 0,5% Coffein entsteht in den stark lichtbrechenden Vakuolen sehr schnell ein Niederschlag aus anfangs kleinen Tröpfchen, die sich rasch zu großen Kugeln vereinen (Abb. 3). Coffeinelösung erweist sich auch hier als ein Reagens, das am vitalen Objekt, auch bei *C. acutiformis*, besonders schnell permeiert.

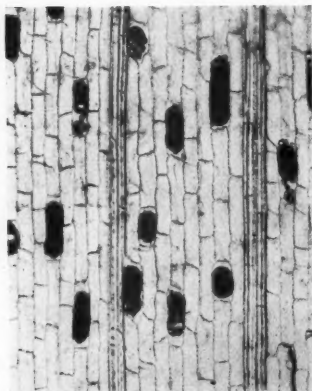


Abb. 3. Coffeinspeicherung in den Gerbstoffidioblasten von *Carex acutiformis*.

Basische Farbstoffe (1 : 10.000 in Leitungswasser gelöst) färben diese Zellen, d. h. speziell ihre Inhaltskörper elektiv an. Toluidinblau wird in rein blauem Farbton gespeichert, während die Vakuolen der übrigen Zellen am Wundrand violett werden. Die Membranen, vor allem die der Faserzellen, sind auch kräftig blau gefärbt, am Wundrand violett. Ebenso wird Neutralrot mit karminroter Farbe in den Idioblasten und Zellwänden, mit ziegelroter Farbe in den Nichtidioblasten am Rande gespeichert. Die Anfärbung der Vakuolen am Rande des Präparates scheint ausschließlich Wirkung des Wundrandes zu sein. Zwar verlagert sich die Front der gefärbten Zellen weiter ins Binnenfeld hinein, doch verbreitert sich außen in gleichem Maße die Zone

toter Zellen. Rhodamin B färbt die Gerbstoffzellen ebenfalls elektiv an, wie es schon Waldheim (1949) für die Gerbstoffzellen im Mesophyll einiger anderer *Carex*-Arten berichtet. Eine Anfärbung der Wundrandzellen unterbleibt jedoch bei diesem Farbstoff. In ihrem Verhalten gegen Acridinorange sind die beiden Arten etwas unterschiedlich. Bei *C. crus corvi* ist nach 16 Stunden in allen Idioblasten aller untersuchten Scheidenstücke verschiedenen Alters grüne Fluoreszenz vorhanden. Vakuolen und Membranen lebender und toter Zellen des Wundrandes fluoreszieren lebhaft rot; dabei haben auch die in der Nähe des Wundrandes liegenden Idioblasten, deren Inhalt grün fluoresziert, Membranen mit roter Fluoreszenz. Bei *C. acutiformis* fluoreszieren lediglich die in unmittelbarer Nähe des Wundrandes gelegenen Idioblasten grün, der Wundrand selber gleicht dem von *C. crus corvi*. Im Binnenfeld des Präparates bleibt der Inhalt der Zellen ungefärbt; Membranen, vor allem die der Faserzellen, leuchten grün. Diese Unterschiede mögen sich vielleicht wieder dadurch erklären, daß im einen Fall der Farbstoff nur vom Wundrand aus in das Gewebe eindringen kann, während er im anderen Fall durch die sehr poröse Cuticula eine

größere Angriffsfläche besitzt. Nach längerer Zeit kommt es zur Rotfluoreszenz aller Idioblasten. Im Hellfeld erkennt man ausgefallene Farbstoffkrümel; die Zellen sterben ab. Acridinorange ist für diese Zellen giftiger als die anderen benutzten Vitalfarbstoffe in gleicher Konzentration.

In hypertonischen Lösungen von Rohrzucker und  $\text{KNO}_3$  hebt sich der Protoplast in allen Zellen gleichmäßig ab, Hechtsche Fäden werden sichtbar; sie sind in den gewöhnlichen Zellen etwas zahlreicher und die an ihnen hängenden Mikrosomen sind kleiner als bei den Gerbstoffzellen. Die

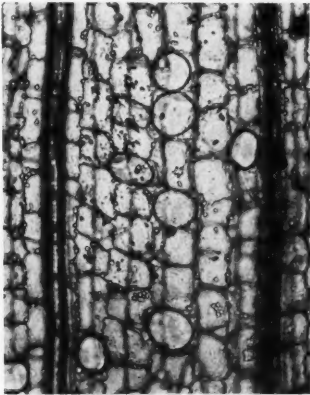


Abb. 4.



Abb. 5.

Abb. 4. Idioblasten von *Carex crus corpi* nach 48 Stunden Aufenthalt in 0,4 mol.  $\text{KNO}_3$ . „Myriophyllum“-Kugeln.

Abb. 5. Cuticularrisse in der Scheide von *C. acutiformis* nach kurzem Erhitzen in Wasser.

Grenzplasmolyse erfolgt bei Idioblasten und bei Nichtidioblasten bei etwa 0,6 mol. In stärker hypertonischen Lösungen verliert auch die Gerbstoffvakuole beträchtlich an Volumen, sie rundet sich stark ab, schließt dabei oft noch die normale Vakuole ein. Nach längerem Aufenthalt in  $\text{KNO}_3$ -Lösungen, gleichgültig, ob es hypo-, iso- oder hypertonische sind, runden sich die Gerbstoffvakuolen ab, zerfallen dabei manchmal in eine größere und mehrere kleinere Kugeln. Sie gleichen dann im äußeren Bild den „Myriophylinkörpern“, wie sie Raciborski (1893) an *Myriophyllum* zuerst beschrieben hat (Abb. 4). Außerhalb dieser Gerbstoffkugeln ist lebhaft Brownsche Molekularbewegung zu beobachten, es sieht so aus, als sei die Zahl der sich bewegenden Teilchen größer geworden. Ob diese Erscheinung sich so deuten läßt, daß intrameiertes  $\text{KNO}_3$  auf osmotischem Wege zur Volumenverminderung des Gerbstoffkörpers beiträgt oder ob Quellungsmechanismen mitwirken, läßt sich freilich noch nicht entscheiden. Die kugelfunde Gestalt scheint auf geringere Viskosität hinzuweisen. Starke Oberflächenkräfte sorgen dafür, daß die Kugeln oft nicht zusammenfließen.

Versuche zur Feststellung der Löslichkeit ergaben, daß dieser Inhaltskörper sich in heißem Wasser herauslösen läßt. Er ist bei *C. crus corvi* auch in Wasser von Zimmertemperatur löslich, wenn das Material vorher in 96% Alkohol abgetötet wurde. Nicht löslich ist er in 96% Alkohol, Benzol, Xylol und Aceton innerhalb von 48 Stunden. Er ist auch in kochendem Wasser nicht löslich, wenn eine der oben erwähnten Gerbstoffreaktionen angestellt wurde. Allgemein ist dazu festzustellen, daß die Lösung bei *C. crus corvi* immer schneller erfolgt. Beim Erhitzen eines in Wasser liegenden Präparates oder bei Behandlung mit Chloralhydrat kann es, vor allem in der Mitte der Scheide, wo die Faserbündel gehäuft auftreten, zu einem Aufreißen der Cuticula über den betreffenden Zellen in Form eines in der Längsachse des Organs orientierten Spaltes kommen, der sich im Tuschepräparat gut sichtbar machen läßt, wenn durch die verschleimende Substanz die Tuschepartikel beiseite gedrängt werden (Abb. 5). Bei *C. crus corvi* hebt sich außerdem die Cuticula häufig als Deckel von etwa Zellgröße ab. Die Zellwand wölbt sich oft mit einer kleinen Ausstülpung vor.

Die älteren außen liegenden Scheidenhäutchen sind nicht selten gebräunt und tot; in ihnen ist auch der Idioblasteninhalt braun geworden und nicht mehr in Wasser löslich. Er gibt aber nach wie vor die meisten der üblichen Gerbstoffreaktionen. Die Probe auf Vorhandensein von Phloroglukotannoiden mit Dimethyl-*p*-aminobenzaldehyd fällt allerdings nur bei wenigen Zellen schwach positiv aus. Die Coffeinreaktion tritt dann nicht mehr ein.

Interessant war das Verhalten toter ungebräunter Inhaltskörper. Dazu wurden Scheidenstreifen frei präpariert und 5 Tage lang bei Zimmertemperatur getrocknet. Die nicht mehr vorhandene Vitalität wurde mit dem Plasmolyseversuch belegt. Die Idioblasten solcher getrockneter Scheiden enthielten ebenfalls noch den gleichen, stark lichtbrechenden Inhaltskörper, der jetzt die ganze Zelle ausfüllt, da die kleineren schwach lichtbrechenden Vakuolen praktisch nicht mehr vorhanden sind. Gegenüber den Nichtidioblasten erscheinen diese Zellen auch in hypertonischen Rohrzuckerlösungen als turgeszent, was gut am Rande einer aufgerollten Scheide durch Vorwölbung zu erkennen ist. Die oben angeführten Reaktionen treten hier in fast gleicher Weise auf wie am lebenden Material. Beide Arten verhalten sich aber wieder etwas unterschiedlich. Während die toten Scheidenstreifen von *C. acutiformis* noch nach 2 Tage langem Aufenthalt in wäßrigen Lösungen voll turgeszente Idioblasten haben, sind sie bei *C. crus corvi* nach einigen Minuten „ausgelaufen“. Danach geben die „ausgelaufenen“ Idioblasten immer noch positive Gerbstoffreaktionen, aber die reagierende Substanz erfüllt bei dieser Art nicht mehr den ganzen Raum der Zelle, sondern ist nur noch an der Wand in krümeliger Form lokalisiert. Nach den Beobachtungen im Tuschepräparat erfolgt das Verquellen dieser Substanz entweder durch eine plötzlich auftretende Öffnung unter raschem Verlust der Turgeszenz, wobei ein Schleimhof entsteht, der an seinem Rand die Tuschepartikel zum Verkleben bringt; oder der Austritt geht sukzessive vor sich durch eine ver-

mutlich sehr kleine Pore. Dabei bildet sich gleich oberhalb der Cuticula eine allmählich größer werdende Tuschekappe adhärierender Teilchen, während die Turgeszenz der Idioblastenzelle langsam abnimmt. In Acridinorange fluoreszieren die Inhaltskörper der toten Gerbstoffzellen, wenn man von der Wundrandzone absieht, deutlich grün. Die Membranfluoreszenz entspricht in Intensität und Farbton dem lebenden Gewebe. Während aber bei *C. crus corvi* die Anfärbung aller Idioblasten des ganzen meist 25 mm<sup>2</sup> großen Präparates schnell und fast gleichzeitig erfolgt (vermutlich durch die Cuticularspalten), schreitet sie bei *C. acutiformis* nur langsam von der Randzone aus vor. Die Erscheinung der Grünfluoreszenz geht bei beiden Arten schneller vorüber als bei lebendem Material. Nach 3–7 Stunden ist keine Grünfluoreszenz des Idioblasteninhaltes mehr zu bemerken, lediglich die Membranen leuchten in stärkerer Intensität grün als die der umgebenden Zellen. Der Idioblastenzellinhalt von *C. crus corvi* läuft schnell aus, und bei *C. acutiformis* fällt der Farbstoff bald krümelig aus. Durch osmotisch wirksame Zucker- und Salzlösungen läßt sich an totem Material keine Schrumpfung des stark lichtbrechenden Körpers erreichen; sie erfolgt aber in organischen Lösungsmitteln wie 96%igem Alkohol, Benzol und in Xylol.

Über die Ausdifferenzierung dieser Gerbstoffidioblasten liegt nur wenig Material vor. Es läßt sich nichts davon beobachten, daß in jungen Zellen die Gerbstoffvakuolen kleiner sind und mit dem Heranwachsen allmählich größer werden, wie das Toriyama (1955) für die Gerbstoffkörper von *Mimosa* und denen von *Robinia* dargelegt hat. Es ist lediglich die Anreicherung einer stärker lichtbrechenden Substanz zu sehen, die in den noch embryonalen Zellen verhältnismäßig den gleichen Anteil am Gesamtzellinhalt besitzt wie in erwachsenen Zellen. Ob von Anfang an zweierlei Vakuolen vorhanden sind, konnte nicht entschieden werden. Von einem sehr frühen Zeitpunkt an, wenn am unbehandelten Objekt noch keine Unterschiede erkennbar sind, lassen sich die zukünftigen Idioblasten mit basischen Farbstoffen elektiv darstellen. Sie färben sich von Anfang an in der Farbe „voller“ Zellsäfte (Höfler 1947). Dabei kommt es sofort zur Bildung kleiner Entmischungströpfchen, die sich innerhalb der nur sehr blaß gefärbten Vakuole in lebhafter Brownscher Molekularbewegung befinden. Später bekommen die Vakuolen festere Konsistenz, sie färben sich homogen mit kräftiger Farbe an. Bildung von Entmischungströpfchen findet bei diesen älteren Zellen nicht mehr statt. In diesem Stadium sind normale ungefärbte Vakuolen deutlich nachzuweisen. Die Differenzierung geht hier also in basipetaler Richtung vor sich, wie das auch Sagromsky (1949) für die Epidermis von *Sedum* beschrieben hat.

Unter dem untersuchten *Carex*-Material fand sich in *C. flava* L. eine Form, die Idioblasten von etwas anderer Beschaffenheit besitzt. Sie sind im unbehandelten Präparat wenig deutlich und wurden erst nach Zugabe von Jodjodkali beobachtet (Abb. 6). Zunächst fallen sie dadurch auf, daß in ihnen Stärke fehlt, die sonst in der Scheide von *C. flava* reichlich vorhanden ist. Die betreffenden Zellen sind plasmareicher und befinden sich

in lockerer Verteilung in einem Längsstreifen nur auf der Mitte der Scheidenhaut. Auf die üblichen Gerbstoffreaktionen sprechen sie nicht an. Gewisse Unterschiede zeigen sich aber bei Anfärbung mit Neutralrot nach 16 Stunden. Während in den Vakuolen der Nichtidioblasten der Farbstoff mit blaß karminroter Farbe wahrnehmbar ist, kommt er in den Idioblasten nur in kleinen karminroten Entmischungströpfchen vor. Das entsprechende Verhalten läßt sich in Toluidinblau beobachten. Nach Plasmolyse mit KCNS fallen die Idioblasten gegenüber den anderen Zellen durch ihren stärker lichtbrechenden Inhalt bei etwa gleicher Kontraktion auf. Wenn

man die mit Neutralrot oder Toluidinblau gefärbten Zellen plasmolysiert, dann kommt es in den gefärbten Vakuolen der gewöhnlichen Zellen zu kleinen Entmischungstropfen, während die Vakuolen der Idioblasten insgesamt farblos bleiben und nur am Rande die oben erwähnten gefärbten Tröpfchen führen. Entsprechend der Färbung ist vielleicht die normale Vakuole der Nichtidioblasten den gefärbten Tröpfchen der Idioblasten homolog zu setzen. Bei dieser Art hat Waldheim (1949) aber im Mesophyll Gerbstoffzellen nachweisen können.

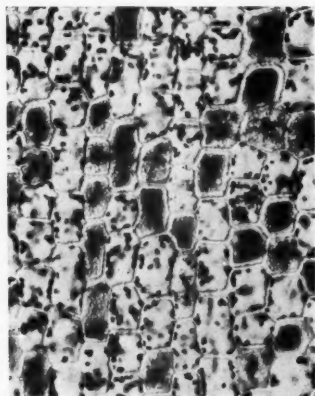


Abb. 6. Idioblasten von *Carex flava* nach Zugabe von Jodjodkali.

In ihrem Aussehen und in ihrem chemischen Verhalten erinnern die Inhaltskörper dieser Idioblasten an die von Raciborski (1893) beschriebenen Myriophyllinkörper, die nach Schilling (1894) unter Wasserpflanzen verschiede-

ner Familien sehr verbreitet sind. Sie reagieren nach eigenen orientierenden Versuchen in gleicher Weise auf Coffein, Eisensalze und auf basische Farbstoffe. Nach eigener kurzer Prüfung liegen unter den von Schilling (S. 333) u. a. beschriebenen Myriophyllinzellen in der Stipel von *Eichhornia crassipes* völlig identisch aussehende und identisch sich verhaltende Gebilde vor (siehe auch Weber 1950).

Dem Aussehen der *Carex*-Vakuolen entsprechen die Bilder, die Klercker (1888, S. 29 und Abb. 11) nach Plasmolyse bei *Quercus*, *Salix*, *Dioon* u. a. erhalten hat. Bei *Quercus* und bei *Doronicum* können Zellen mit großen Gerbstoffvakuolen und solche mit kugelförmigen Ausscheidungen vorkommen.

Wie ebenfalls kurz geprüft, geben fast die gleichen Reaktionen auch die von Pfeffer (1873) festgestellten Gerbstoffvakuolen in der Rinde des Blattstielgelenkes von *Mimosa pudica*. Nur die Angabe Pfeffers über bläuende Wirkung der Eisensalze konnte nicht bestätigt werden. Beim hiesigen *Mimosa*-Material zeigte sich nur Braunfärbung. Toriyama, der diese Körper an *Mimosa* und an *Robinia* genauer untersucht hat (1955),



findet an ihnen zwar morphologische Unterschiede in Abhängigkeit vom jeweiligen Reizzustand, doch seien diese Tanninkörper nicht von direkter Bedeutung für die Bewegung der Gelenke, da auch junge Keimpflanzen bereits reagieren, ohne solche Vakuolen ausgebildet zu haben. Über das Fehlen dieser Inhaltskörper bei *Mimosa*-Keimlingen berichtete schon Pfeffer (1873, S. 13). Außerdem sind nach seinen Angaben die Gerbstoffvakuolen nicht nur auf die Gelenkpolster beschränkt, sondern finden sich ebenfalls im Parenchym des Blattstiels, des Stengels und bei vielen anderen Pflanzen. Umgekehrt können sie in den Zellen anderer in gleicher Weise reizbarer Organe fehlen.

Bei den Myriophyllinkörpern handelt es sich aber um kugelige Gebilde, die nur einen geringen Teil der gesamten Vakuole ausmachen, während bei allen untersuchten *Carex*-Arten dieser Körper wesentlich größer ist und die normalen Vakuolen nur wie aus ihm herausgeschnitten erscheinen. Diese Formunterschiede mögen auf Viskositätsdifferenzen zurückzuführen sein. Vielleicht aber sind diese Körper von einer semipermeablen Haut eingeschlossen und dadurch in ihrem Volumen von der Konzentration der normalen Vakuole abhängig, wie Pfeffer (1873, S. 14; 1877, S. 181) es für Gerbsäuretropfen allgemein angibt (siehe auch Klercker). Eine solche Membran ist vielleicht das, was als Rest einer „ausgelaufenen“ Idioblastenzelle bei *C. crus corvi* nachzuweisen ist. Bei toten Zellen müßte eine solche Haut ihre semipermeablen Eigenschaften wenigstens für Rohrzucker, Glycerin und  $\text{KNO}_3$  verloren haben, denn in osmotisch wirksamen Lösungen lassen sich keine Schrumpfungen der tannoiden Inhaltskörper mehr erzielen. Sollten die beschriebenen Gerbstoffvakuolen der verschiedenen Pflanzen untereinander identisch sein, dann wäre zu erwarten, daß sie unter bestimmten Bedingungen auch bei *Carex* in der „Myriophyllum-Form“ auftreten könnten und umgekehrt. *Myriophyllum*-ähnliche Kugeln konnten bei *Carex* regelmäßig beobachtet werden, wenn die Präparate längere Zeit in  $\text{KNO}_3$ -Lösungen verblieben (Abb. 4).

Ähnliche Gerbsäuretropfen lassen sich z. B. an Wurzeln von *Azolla* durch Konzentrierung des Zellsaftes auf dem Wege der Plasmolyse erzeugen (Pfeffer 1886, S. 245). Nach Deplasmolyse verschwinden sie dann wieder ohne Rückstand. Eine Niederschlagshaut kann sich an ihrer Oberfläche dabei noch nicht gebildet haben, sonst könnte diese künstlich hervorgerufene Ausscheidung als Modell für einen natürlichen Vorgang dienen. Daß solche tanninhaltigen Vakuolen neben normalen auch bei vielen anderen Objekten vorkommen, geht aus der von Guilliermond (1941) gegebenen Aufstellung hervor.

Gewisse Ähnlichkeit scheint auch mit den von Härtel (1951) beschriebenen Inhalten der Epidermiszellen von *Pirola secunda* vorzuliegen. Die Gerbstoffreaktionen fallen in gleicher Weise aus, Lipide fehlen ebenso wie dort. Entsprechend wie bei *Pirola* verhalten sich auch die Zellen nach Fluorochromierung mit Acridinorange, es kommt später zur Krümelbildung und die Fluoreszenz wird rot. Mit Dimethyl-*p*-aminobenzaldehyd gibt es allerdings bei *Pirola* eine tropfige Entmischung (Härtel, S. 349),

bei *Carex* bleiben die Idioblasten anfangs homogen und werden dann krümelig braun.

Diese tannoiden Inhaltskörper finden sich also bei Vertretern der verschiedensten Familien an sehr unterschiedlichen Pflanzenteilen. Die Mannigfaltigkeit ihres Auftretens läßt keine allgemeinere Schlußfolgerung für ihre Bedeutung zu. Man hat versucht, sie in Beziehung zur Schleimbildung zu bringen (Schrenk 1888), und sie erscheinen tatsächlich oft an schleimproduzierenden Organen. Schilling, der dies für viele Pflanzen beschrieben hat, glaubt nicht an einen direkten Zusammenhang zwischen ihrem Vorkommen und der Produktion von Schleim. Für *Carex* ist auffällig, daß die Idioblasten nur dort auftreten, wo das Gewebe aus zwei Schichten besteht, und das ist im vegetativen Bereich nur an der Scheide und am Rande der Ligula der Fall. Es sollte geprüft werden, ob das im floralen Bezirk auch so ist. Ferner ist auffällig, daß sie nur in chlorophyllfreien Partien entstehen und daß die Idioblasten auch dort, wo die Scheide sonst Stärke führt, meist stärkefrei bleiben.

Es handelt sich hier also um eine besondere Vakuole mit tannoidem quellbarem Inhalt, der vielleicht bei *C. crus corvi* von einer eigenen Haut umschlossen wird. Daß außer Gerbstoffen noch andere Bestandteile den stark lichtbrechenden Körper aufbauen, scheint mir sicher. Nach Klercker (S. 27) könnte die Größe der Gerbstoffblasen von der osmotischen Wirksamkeit der Beimengung abhängig sein. Proteine kommen nach dem negativen Ausfall der Millon-Reaktion und nach dem Ausbleiben der Koagulation beim Erhitzen in Wasser nicht in Frage. Vielleicht können weitere Untersuchungen an diesen gut zugänglichen *Carex*-Scheiden zur genaueren Analyse dieser und ähnlicher Gerbstoffkörper führen.

### Zusammenfassung

In dem zweischichtigen Scheidenteil vieler *Carex*-Arten befinden sich Idioblasten, die besondere, stark lichtbrechende Gerbstoffvakuolen neben kleinen, normalen, schwach lichtbrechenden Vakuolen führen. In getrocknetem Material geben die Inhaltskörper der Idioblasten die gleichen Reaktionen auf Gerbstoffe wie in vivo. In wässrigen Lösungen können die toten Idioblasten wieder turgeszent werden. Sie speichern basische Farbstoffe in lebendem und in getrocknetem Zustand in dem für „volle“ Zellsäfte typischen Farbton; Fluorochromierung mit Acridinorange ergibt in beiden Fällen anfangs grüne Fluoreszenz der tannoiden Substanz. Diese Inhaltskörper scheinen den Myriophyllinkugeln von *Myriophyllum spicatum* und vielen anderen Wasserpflanzen nahe zu stehen und sind auch mit den Gerbstoffvakuolen in den Blattgelenken von *Mimosa pudica* und *Robinia pseudacacia* zu vergleichen.

### Literatur

- Guilliermond, A., 1941: The cytoplasm of the plant cell. *Chronica Botanica* VI. Waltham, Mass.  
Härtel, O., 1951: Gerbstoffe als Ursache „voller“ Zellsäfte. *Protoplasma* 40, 338.

- Höfler, K., 1947: Einige Nekrosen bei Färbung mit Acridinorange. S.ber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl., Abt. I, 156, 585.
- Klercker, J. E. F., 1888: Studien über die Gerbstoffvakuolen. Bihang till k. Svenska Vet.-Akad. Handlingar 13, 1.
- Pfeffer, W., 1873: Physiologische Untersuchungen. Leipzig.
- 1877: Osmotische Untersuchungen, Leipzig.
- 1886: Über die Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. Untersuchungen aus dem Bot. Inst. Tübingen II. Leipzig.
- Raciborski, M., 1895: Über die Inhaltskörper der *Myriophyllumtrichome*. Ber. dtsh. bot. Ges. 11, 348.
- Sagromsky, H., 1949: Weitere Beobachtungen zur Bildung des Spaltöffnungsmusters in der Blattepidermis. Z. Naturforsch. 4b, 360.
- Schrenk, J., 1888: On the histology of the vegetative organs of *Brasenia peltata* Pursh. Bull. Torrey Bot. Club 25; zitiert nach Schilling.
- Schilling, A.-J., 1894: Anatomisch-biologische Untersuchungen über die Schleimbildung der Wasserpflanzen. Flora 78, 280.
- Toriyama, H., 1955: Observational and experimental studies of sensitive plants V. The development of the tannin vacuole in the motor cell of the pulvinus. Bot. Mag. Tokyo 68, 205.
- Waldheim, W., 1949: Differentialfärbung mit Rhodamin B. Darstellung der Gerbstoffzellen im *Carex*-Blatt. Mikroskopie 4, 46.
- Weber, H., 1950: Morphologische und anatomische Studien über *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. Abh. math.-naturw. Kl., Akad. Wiss. u. Lit. Mainz Nr. 6.

# Growth of $^{14}\text{C}$ -labelled Starch Granules in Potato Tubers as Revealed by Autoradiographs

By

N. P. Badenhuizen<sup>1</sup> and R. W. Dutton

Communication from the Radio-Isotope Unit, Postgraduate Medical School,  
Ducane Road, London, W. 12

With 6 Text-figures

(Received December 17, 1955)

## Introduction

The way starch granules grow has always been a subject for much speculation. In his classical work, Arthur Meyer [10] gave strong arguments in favour of growth by apposition (centrifugal deposition of successive layers). This theory is capable of explaining many observations [1] and implies structural equality of all the layers of a granule (water content excluded) as has been demonstrated for potato and other starches in general, with the notable exception of waxy maize [2]. Growth by apposition is irreconcilable with the existence of an outer membrane with special properties [3].

In contrast, growth by intussusception (deposition of starch inside the granule) is believed to require the presence of such a membrane [14], which often in the past has furnished investigators with a convenient explanation for various observations made during the swelling of starch granules (for a recent example see [9]), although its existence cannot be demonstrated [1, 3].

Even when growth takes place by apposition, the process may involve rapid periodical crystallization of the granule from a coacervate, as suggested by MacMasters (see [2]), or this process could be a slow one, layer after layer being deposited through the same fundamental process of crystallization from a saturated solution.

It has not been possible to watch starch granules growing in living tissues with the indirect method of observation available, and it was there-

<sup>1</sup> Permanent address: Department of Botany, University of the Witwatersrand, Johannesburg, S. Africa.

fore necessary to find a method which would make the growth of a starch granule more directly visible. It was believed that this could be done if the substrate was labelled and growth followed by autoradiography. The technique, as developed by Pelc [12] offered great possibilities [5] and was therefore applied.

### Materials and Methods

Young potato plants, grown from tubers, were put into the assimilation chamber of an apparatus, developed by one of us [6] and allowed to photosynthesise in an atmosphere containing  $^{14}\text{CO}_2$ , using activities in the range 75–400  $\mu\text{C}$ , and total  $\text{CO}_2$  concentrations from 0.1–1.5% (calculated for empty apparatus).

Parts of the stems were shielded from the light to prevent photosynthesis, and surface activities of these parts, and of leaves, stolons, and tubers, were measured with thin mica and window counters at various periods after the treatment. In some cases, roots and tubers were washed free of soil, in other cases plants were left undisturbed, and returned to the greenhouse, where they stayed for as long as 8 days before further investigation. As a rule plants were not de-starched before treatment. The flower pots were wrapped in plastic material, to avoid loss of  $^{14}\text{CO}_2$  into the soil.

A thin slice was cut from the middle part of each tuber and autoradiographs were prepared from these slices on X-ray film. In some cases one half of the tuber was dried, and starch was isolated from the other half, in other cases the whole tuber was used for starch isolation. For some of the bigger tubers, (maximum weight 17.5 g.), specific activities of ground dry tissues and the corresponding starches were measured at infinite thickness and compared. The size of the tubers investigated varied from 4–34 mm. on the long axis. Extracts were made of some of the dried material by refluxing in 80% alcohol. After concentrating *in vacuo* the residue was taken up in a little water. Sugars present were separated by filter paper chromatography, using a pyridine-butanol-water mixture as solvent. Spots were located with  $\alpha$ -naphthoresorcinol or benzidine as spraying reagents and also by means of autoradiography.

The stripping-film technique of Pelc [12] was applied to dried-in starch preparations on slides covered with an adhesive layer. Starch granules were studied before and after treatment with saliva at 40°C., and also after partial gelatinization with or without simultaneous action of saliva.

### Results

#### A. General distribution of activity

Surface activity of the leaves dropped sharply during the first 10 hours, and then more gradually during the following 10 hours, tending to approach a constant residual level at about  $\frac{1}{3}$  the initial value. In the meanwhile, darkened portions of the stem increased in surface activity, so that evidently active material was transported downwards.

The most surprising result was, that even after 8 days the activity of the tubers varied over a very wide range, some being highly active, whilst others were quite inactive. There was no relation between tuber size and degree of activity. This result still remains unexplained. The starch in the mother tuber remained inactive.

Autoradiographs of slices developed after 2 days exposure time showed a weak initial equal distribution of activity throughout some tubers, with the periderm standing out clearly. In this stage (I), the specific activity of the dried tuber tissue was of the order of  $1 \mu\text{C/g.}$ , all of this activity being in the cytoplasm, and none in the starch granules or parenchyma cell wall material.

For other tubers of the same plant, this equally distributed activity was found to increase in intensity, until a specific activity (dried material) of the order of  $10 \mu\text{C/g.}$  was reached, beyond which value starch granules also tended to become active (stage II). At still higher specific activities starch granules became highly active, a process which gradually extended throughout the tuber, starting at the end opposite the stolon (stage III). Chromatograms showed that of the sugars present, sucrose carried the bulk of activity, with very little activity in the glucose spots, and still less in the fructose spot.

## B. Starch granules

### 1. Untreated

Active stolons (specific activity about  $13 \mu\text{C/g.}$ ) were found to carry inactive starch granules. In tubers of similar specific activity (stage II)



Fig. 1. Radioactive starch granules from a potato tuber. Specific activity of dried tuber tissue  $60 \mu\text{C/g.}$ , that of the starch  $88 \mu\text{C/g.}$   $250\times$ .



a great many starch granules were still inactive, and the remainder might show various levels of activity, from barely perceptible to more clearly visible, with sometimes a sprinkling of highly active granules.

In very active tubers, practically all granules were active, but they again showed various intensities (Fig. 1). There was no relation between degree of activity and size of the starch granule.

Individual granules showed highest activity at the distal end (Figs. 2 and 4). If the activity had been equally distributed throughout a granule,

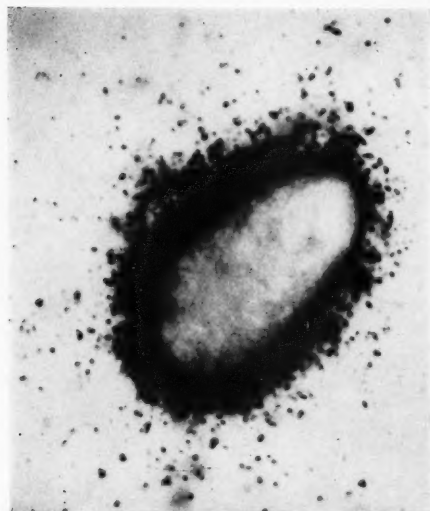


Fig. 2.

Fig. 2. Labelled starch granule showing greater activity at distal end, focussed on margin. 1250 $\times$ .

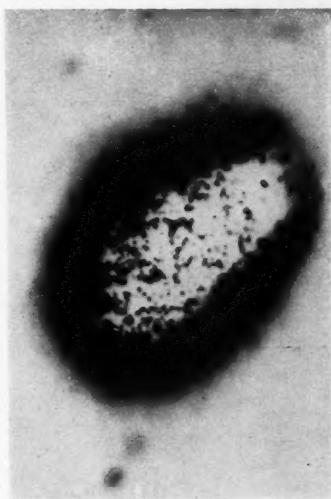


Fig. 3.

Fig. 3. The same starch granule as in Fig. 2, but focussed on upper surface. 1250 $\times$ .

one would expect a greater concentration of silver grains above the centre of the granule. In reality, the concentration is greater along the margin (Fig. 3). The combination of these facts provides a strong argument for growth by apposition, when we realise that layers are broader at the distal end and more crowded and thinner at the proximal end. A. Meyer has already attributed this to the unequal distribution of amyloplast material.

In a number of cases some starch granules were found to be much more active than was expected from the study of granules from tubers of similar specific activity. Their activity often had a very irregular distribution, e.g., in the shape of cross bands (centre of Fig. 4). It is possible that these strong localised activities were due to residues of amyloplasts adhering to the starch granules. Detection of activity in granules

was much more difficult in tissue smears or in paraffin sections, the active cytoplasmic material masking the granules effectively. It was possible to

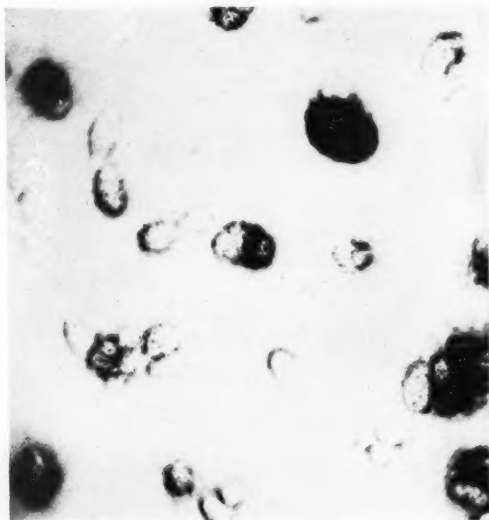


Fig. 4. Possible amyloplast residues of high activity attached to some granules. Other granules show the ordinary activity at their distal end. 250 $\times$ .

"clean" the granules by treating the smears with a solution of trypsin at 40 $^{\circ}$  C., but the protein, which precipitated after the unavoidable drying process, could not be washed out.

## 2. Swollen and saliva-treated granules

For the following experiments the same starch sample (see Fig. 1) was used throughout. The distal end of the swollen sac-shaped granule (heated in water) showed a markedly greater activity as compared to the proximal end, until the sac became too much extended. As a consequence, it was often possible to indicate the site of the distal end even in gelatinised starch granules. During swelling, much material (mainly the linear fraction) goes into solution, and therefore these preparations showed a high background.

When starch granules were subjected to the action of saliva at 40 $^{\circ}$ , corrosion took place as described earlier [1, 3]. The corroded residues gradually became inactive, the process starting at the proximal end (Fig. 5). Agglomerates of active material were often found near the inactive residues. When starch granules are heated in water at not too high a temperature, they may become partly gelatinised, the proximal end swelling first. When the same experiment is done in saliva, those swollen proximal ends will be degraded rapidly, leaving an unswollen residue with

the inner mass exposed. Wherever such residues were found, the inner mass showed no activity (Fig. 5). As was to be expected, the dissolved material gave a high background in such preparations, which is also shown in a photograph of the same granules, focussed at a higher level (Fig. 6). This comparison is necessary as the film bulges over the relatively big objects.

### Discussion

All observations point to the conclusion that the growth of all starch granules, small and large, in potato tubers takes place by apposition. The newly formed layer is thickest at the distal end and there we find the



Fig. 5. Starch granules of potato after labelling and treatment with saliva near gelatinization temperature. Top left: activity disappears first at the proximal end; active material of the distal end partially dispersed. To the right a granule showing the inactive inner substance. Below: two residues which have become inactive. Focussed on margin. 1250  $\times$ .

greatest activity. The inner mass of the granule, whenever exposed, shows no activity. When the outer layers are removed by applying amylase action, the thinnest parts at the proximal end lose their activity first, and at last all activity disappears.

This result clearly is in contradiction with the existence, sometimes assumed, of an outer membrane with special properties.

That some tubers have not become active after 8 days is a mystery that can only be solved by further studies of carbohydrate transport into the tubers under different conditions. In the meanwhile, the varying activity

displayed by tubers harvested from one plant, made it possible to follow different stages of carbohydrate influx and starch deposition simultaneously. From their comparison we can reconstruct the following picture.

Sucrose travels down the stem and enters the tuber, spreading evenly throughout the parenchyma. Very likely amyloplasts, which contain the necessary enzyme systems, convert sucrose, by a process as yet unknown, to a starch-like substance, and this starts to crystallise out when a certain concentration has been reached. The fact that starch granules only very

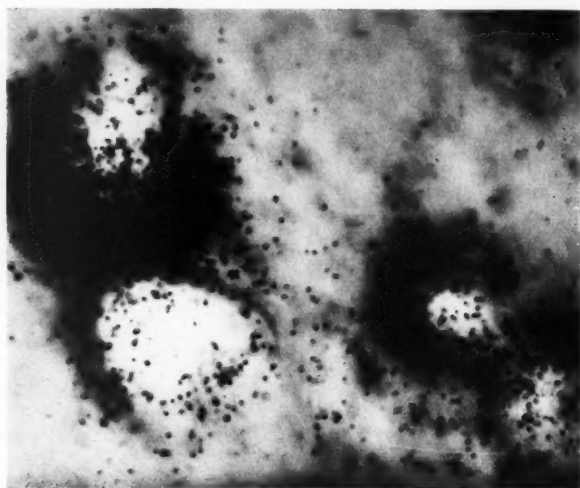


Fig. 6. The same granules of Fig. 5 focussed on the upper surface. 1250  $\times$ .

gradually become active, points to the possibility that starch is deposited in very thin lamellae, which gradually build up a layer. This process starts at the far end of the tuber, as in radishes [11], and proceeds more rapidly along the peripheral parts of the potato than in the central part, in the direction of the stolon. There is a possible relation to the discovery that phosphorylase is most active in the tips and buds of the tubers [8].

The indications are that starch deposition is a process which is mainly dependent upon the amount of sugar available, and that the latter bears no relation to the day-night alternation. As there does not appear to be a fluctuation in total phosphorylase activity during 24-hour periods [4], factors controlling substrate transport and concentration have to be studied. In our experiments it is difficult to relate these factors to an inner rhythm of the plant, as proposed by Hess [7], because all tubers behaved in a different way.

It is interesting to note that sometimes no starch deposition was found in the first swellings of the stolons, although according to Plaisted [13] these small tubers should have been in a period of rapid starch accumu-

lation. In contrast, large tubers of the same plant might show intensive starch deposition, although here the process should be slower and more constant than in the tiny ones.

Evidently the influx of sugar may stop for a long time, and as a result the deposition of a layer can be a very slow process; in other cases it might proceed more rapidly.

### Summary

Experiments have been presented which indicate that the layers of potato starch granules are built up by a gradual process of apposition. This process is dependent upon the supply of carbohydrates to the amyloplasts. The stripping film technique has made it possible for the first time to make starch granule growth more directly visible.

### Acknowledgments

We are indebted to the Royal Society and the Nuffield Foundation (N.P.B.), and to the Medical Research Council (R.W.D.) for grants, to Prof. E. J. King for his hospitality, and to Drs C. E. Dalglish and S. R. Pelc for invaluable help and advice.

### References

- [1] Badenhuizen, N. P., 1938: Das Stärkekorn als chemisch einheitliches Gebilde. *Rec. Trav. Bot. néerl.* 35, 559.
- [2] — 1955: Observations on the distribution of the linear fraction in starch granules. *Cereal Chem.* 32, 286.
- [3] — 1955: The structure of the starch granule. *Protoplasma* 45, 315.
- [4] — and M. I. Malkin, 1955: Phosphorylase activity in relation to the layering of starch granules. *Nature* 175, 1154.
- [5] Doniach, I., A. Howard, and S. R. Pelc, 1955: Autoradiography. *Progr. in Biophys. (and Biophys. Chem.)* 3, 1.
- [6] Dutton, R. W., 1955: The biological production of isotopically labelled compounds and their metabolic significance. Ph. D. Thesis, London University.
- [7] Hess, C., 1955: Über die Rhythmik der Schichtenbildung beim Stärkekorn. *Z. Bot.* 45, 181.
- [8] Hori, S., 1955: Starch formation in potato tubers. *Chem. Abstr.* 49, 7657 i.
- [9] Knyaginichev, M. I., Y. R. Bolkhovitina, and T. A. Maksakova, 1955: Significance of the coating membrane of starch grains in relation to the properties of starch. *Chem. Abst.* 49, 9508 e.
- [10] Meyer, A., 1895: Untersuchungen über die Stärkekörner. Fischer (Jena).
- [11] Ono, H., 1955: Intracellular conditions which control the interchange of starch and sugar in plants. *Chem. Abstr.* 49, 9758 g; *Japan. J. Bot.* 15, 28.
- [12] Pelc, S. R., 1947: Autoradiograph technique. *Nature* 160, 749.
- [13] Plaisted, P. H., 1954: Growth of the potato tuber. *Iowa State Coll. J. Sci.* 28, 580.
- [14] Wieler, A., 1955: Über Niederschlagsbildungen in Pflanzenzellen. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 53, 577.

# **Untersuchungen über die antagonistische Wirkung der Mono- und Disaccharide sowie der mehrwertigen Alkohole bei der Wirkung von Säuren auf das Pflanzenplasma**

## **II. Mitteilung**

Von

**Hugo Kaho, Hamburg**

Mit 6 Textabbildungen

*(Eingegangen am 21. Oktober 1955)*

Es ist eine bekannte Tatsache, daß Säuren auch in schwachen Konzentrationen für das Pflanzenplasma sehr giftig sind und es binnen kurzer Zeit abtöten. Die Aktivität der Säuren ist von ihrem Gehalt an freien H-Ionen abhängig, weil sie die elektrische Ladung der Plasmakolloide neutralisieren, Eiweißstoffe und Lipoide irreversibel koagulieren. Aus diesem Grunde sind für das Pflanzenplasma die stark dissoziierten Mineral- und organischen Säuren besonders giftig, während die schwachen Säuren bei gleicher molekularer Konzentration, wegen der kleineren Anzahl der freien H-Ionen in der Lösung, weniger schädigend wirken. Bei gleichen H-Ionenkonzentrationen wird das Pflanzenplasma von allen Säuren in einer annähernd gleichen Zeit abgetötet.

Wird ein Disaccharid, z. B. Rohrzucker, in wässriger Säurelösung erwärmt, so wird es allmählich hydrolytisch gespalten (Inversion), und nach einiger Zeit wird sich in der Lösung nur Glukose und Fruktose befinden. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse hängt von der Konzentration der H-Ionen ab, und man kann die Stärke der Säuren nach den Geschwindigkeitskonstanten der Inversion beurteilen.

Bei Zimmertemperatur geht in einer schwachen Säurelösung, z. B. pH 4–5 die Inversion sehr langsam vor sich.

Um eine Übersicht zu bekommen, inwieweit die Disaccharide in den unten folgenden Versuchen invertiert werden, wurde eine Reihe von Versuchen mit der Inversion von Rohrzucker mit schwachen Konzentrationen verschiedener Säuren gemacht.

Es muß vorausgeschickt werden, daß der käufliche Zucker stets kleine Mengen reduzierender Zucker enthält und mit Fehling einen leichten Niederschlag gibt. Sogar ein Rohrzucker-Präparat von Merck (Darmstadt), das etwa zwei Jahre im



Schrank gestanden hatte, gab mit Fehling einen deutlichen roten Niederschlag, was auf die Spuren von Invertzuckern hinweist. Es wurde deswegen mit frischen Zuckerpräparaten von Merck gearbeitet.

Es wurden 3 cm<sup>3</sup> 0,5 mol Saccharoselösung mit der gleichen Menge einer Säure bei ca. 20° gemischt, auf 1–2 Stunden stehen gelassen und mit Fehling (à 2 cm<sup>3</sup>) die Kupferhydroxydreaktion durchgeführt. Da es sich bei diesen Versuchen nur um qualitative Schätzungen handelt, so werde ich auf eine ausführlichere Beschreibung verzichten und nur zusammenfassend sagen, daß durch die schwachen Konzentrationen der Säuren, z. B. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,001 n, Oxalsäure 0,0025 n, Essig- und Weinsäure 0,01 n, in den ersten 10 Stunden nach und nach schätzungsweise ca. 20% des Disaccharids invertiert werden.

Kocht man die Saccharose eine Zeit mit denselben Säuren, so erhält man mit Fehling einen etwa fünfmal größeren Cu<sub>2</sub>O-Niederschlag.

In den unten folgenden Versuchen werde ich annehmen, daß in den Versuchen mit schwachen Säurelösungen und Disacchariden nach 10 Stunden sich ungefähr 20% Invertzucker gebildet haben. In den ersten Stunden ist die Menge des Invertzuckers allerdings geringer.

Die Versuche wurden mit Flächenschnitten von Rotkohl, *Rhoeo discolor* und Stücken der Blütenblätter von *Viola tricolor* (schwarze Varietät) angestellt. Die Versuche mit Rotkohl und *Rhoeo* wurden in derselben Weise, wie in der I. Mitteilung dieser Arbeit bemerkt<sup>1</sup>, ausgeführt. (Näheres über diese Methode s. K a h o 1923, 1933.)

Für eine jede Versuchsreihe wurden bei *Viola* alle Schnitte von ein und derselben Blüte genommen. Die Blütenblätter wurden in quadratische Stücke (1–1,5 cm<sup>2</sup>) geschnitten, gut gewaschen und sehr sorgfältig sortiert, so daß die etwas beschädigten oder auch die sonst nicht normal aussehenden Schnitte entfernt wurden. Bei der Untersuchung wurden die Schnitte ins Leitungswasser gelegt und, um die lebenden Zellen zu identifizieren, in einen angeglichenen Plasmolytikum plasmolysiert. Alle plasmolysefähigen, bei höheren Zuckerkonzentrationen deplasmolysefähigen, Zellen wurden als lebende betrachtet.

Es muß gesagt werden, daß die antagonistische Wirkung (a. W.) der Zucker gegen Säuren gleichwie gegen Neutralsalze als Durchschnitt einer großen Zahl von Versuchen betrachtet werden kann. Die Stärke der Säuren wurde in den Vorversuchen so festgesetzt, daß die Schnitte im Kontrollversuch ungefähr innerhalb von 5–10 Stunden abstarben. Dann wurden die Versuche abgebrochen. In einigen Ausnahmefällen dauerten sie etwas länger. Im allgemeinen sollten die Versuche nicht auf eine längere Zeit ausgedehnt werden, weil in solchen Fällen noch andere schädigende Faktoren auftreten konnten und das ausschließliche Wirkungsbild der Säure beschattet hätten.

Um es unten bei den einzelnen Tabellen nicht zu wiederholen, sei hier gesagt, daß in der Regel in der reinen Säure, die die Schnitte enthielt (Kontrollversuch), zuerst eine rötliche Abtönung der Lösung zum Vorschein kam und dann erst später in den Mischungen Säure-Zucker allmählich auftrat. Der Austritt des Anthocyans aus den Zellen zeigt immer eine irreversible

<sup>1</sup> K a h o, H., diese Zeitschrift 45, 560.

Koagulation der Plasmamembran. Die schwach rote Abtönung der Flüssigkeit, in der sich die Schnitte befinden, weist darauf hin, daß einige Zellen schon abgestorben, nicht aber daß alle tot sind. Da die Individualität der Zellen sehr groß ist, so werden im Verlauf des Versuches einige Zellen, in erster Linie an den Rändern der Schnitte, die beim Herstellen der Schnitte etwas mehr als die anderen in Mitleidenschaft gezogen sind, bald absterben. Allerdings sind das nur vereinzelte Zellen. Wenn man in Betracht zieht, daß bei jedem Versuch 100–150 Schnitte verwendet wurden, so ist es verständlich, daß diese vereinzelt Zellen der Lösung bald einen rötlichen Schimmer geben, obwohl die Schnitte vor der Verwendung mit Leitungswasser mehrere Male gewaschen wurden. Alle übrigen Zellen sind dabei intakt. Im weiteren Verlauf der Versuche nimmt die rötliche Färbung in den Probegläsern zu, am meisten beim Kontrollversuch, bei den Säure-Zucker-Gemischen dagegen weniger. Bei einigen Versuchen bleibt die Lösung mehrere Stunden farblos. Die Versuche wurden serienweise unter gleichen Versuchsbedingungen angestellt. In jeder Tabelle ist eine Serie dargestellt. Die Zucker bzw. Alkohole wurden den Säuren in Substantia zugesetzt. Die angegebenen Mengen in Mol beziehen sich auf die Konzentrationen in den Lösungen.

Alle Chemikalien stammen von Merck, Darmstadt. Bei flüssigen Säuren (HCl,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  u. a.) wurden die verwendeten Konzentrationen aus dezinormalen Lösungen (Merck) durch Verdünnung hergestellt.

### Mineralsäuren

Tabelle 1.

*Rheo discolor*. HCl ca.  $1/400$  n; pH 4,4. Temp. 19°.

Einwirkungszeit der Lösungen	HCl $1/400$ % (Kontrollv.)	do + $\frac{1}{2}$ Maltose			
		0,05 m	0,08 m	0,1 m	0,3 m pH 4,6
pH 4,5					
Jede Zahl zeigt die Prozente der lebenden Zellen in 10 Schnitten					
1 Stunde	100	100	100	100	100
2 Stunden	87	97	95	100	80
4     „	82	95	90	95	25
6     „	72	92	95	62	10
8     „	45	55	57	40	5
10    „	37	52	56	37	10
12    „	18	40	42	23	0
Mittelwert (%) <sup>2</sup>	63	76	75	65	31

<sup>1</sup> „do“ bedeutet die verwendete Säure in derselben Stärke wie beim Kontrollversuch.

<sup>2</sup> Der Mittelwert zeigt die a. W. eines Zuckers schon deutlich an, wenn er mindestens um 10% höher als der des Kontrollversuches ist, alle Zeitabschnitte eingerechnet.

Die Versuchsreihe mit *Rheo discolor* (Tab. 1) zeigt die a. W. der Maltose gegen Salzsäure. Im Kontrollversuch sind nach 12 Stunden über 80% der

Zellen tot, während in Gegenwart schwacher Zugaben von Maltose (0,05 bis 0,08 m) nur 60% abgestorben sind. 0,1 Maltose hat in dieser Versuchsserie keine a. W., 0,3 mol wirkt schon synergetisch: die Zellen sterben hier schneller als in der reinen Säure ab. Im allgemeinen nimmt die a. W. in stärkeren Zuckerlösungen zu, in einigen Ausnahmefällen dagegen wirken hypertonische Zuckerlösungen in Verbindung mit den Säuren in höherem Maße schädigend als die Säure allein. Ein solcher Fall liegt hier vor.

Tabelle 2.

*Viola tricolor*. HCl ca.  $\frac{1}{1000}$  n; pH in allen Lösungen 5,0<sup>1</sup>. Temp. 20°.

Einwirkungszeit der Lösungen	HCl $\frac{1}{1000}$ n (Kontrollv.)	do + Mannose	do + Saccharose	do + Maltose	do + Laktose
		Alle Zucker 0,5 mol			
		Jede Zahl zeigt die Prozente der lebenden Zellen in 10 Schnitten			
30 Minuten	100	100	100	100	100
1 Stunde	87	97	100	100	100
1 Stunde 30 Minuten	62	88	95	100	100
2 Stunden	58	87	95	100	100
3 „	50	80	86	100	100
5 „	30	60	75	95	100
7 „	25	40	63	92	95
9 „	20	32	50	83	90
12 „	20	25	47	80	90
21 „	0	0	20	62	45
Mittelwert (%)	45	61	73	91	92

<sup>1</sup> Wo nichts anderes gesagt ist, bezieht sich pH auf alle in einem Versuch verwendeten Lösungen.

In der Tabelle 2 ist eine vergleichende a. W. der Mannose und dreier am meisten vorkommender Disaccharide dargestellt. Die Versuche zeigen, wie giftig auch eine sehr schwache Lösung von HCl (pH 5,0) für das Plasma der Blütenblätter von *Viola* sein kann. Die Zellen sterben hier nach etwa 20 Stunden ab. Die Zugabe von Zuckern wirkt gegen die Säure deutlich antagonistisch, die Mannose allerdings schwächer als die Disaccharide. Von den letzteren hat die Saccharose eine schwächere a. W., also: Mannose < Saccharose < Maltose, Laktose (s. auch Abb. 1).

Die Tabelle 3 zeigt eine deutliche a. W. der Laktose gegen die Schwefelsäure. Dieses Disaccharid bindet ziemlich stark freie H-Ionen bzw. wird die Dissoziation zurückgedrängt. Die reine Säure hat hier eine pH 4,4, dagegen im Gemisch mit 0,8 Maltose ist pH 4,8; die Konzentration der freien H-Ionen ist bedeutend geringer als im Kontrollversuch. Dieser Umstand hat ohne Zweifel einen Einfluß auf die koagulierende Wirkung der Säure auf das Plasma. Doch kann das nicht allein die einzige Ursache der a. W. des Zuckers sein. Die niedrigste Konzentration der Laktose (0,03 mol, pH 4,5) hat eine

größere a. W. als die höheren, die pH 4,7 haben, ausgenommen 0,8 mol Laktose.

Tabelle 3.

Rotkohl.  $H_2SO_4$  ca.  $\frac{1}{450}$  n; pH 4,4. Temp. 20°.

Einwirkungszeit der Lösungen	$H_2SO_4$ $\frac{1}{450}$ n (Kontr.)	do + Laktose					
		0,03 m pH 4,5	0,06 m pH 4,6	0,1 m pH 4,6	0,2 m pH 4,7	0,4 m pH 4,7	0,8 m pH 4,8
		Jede Zahl zeigt die Prozente der lebenden Zellen in 10 Schnitten					
1 Stunde	100	100	100	100	100	100	100
2 Stunden	92	95	97	100	100	100	100
3 „	45	97	95	97	92	72	100
4 „	20	92	73	80	83	48	100
5 „	15	77	70	45	55	36	95
6 „	0	75	78	62	52	30	92
Mittelwert (%)	45	89	85	81	80	64	98

Es wurden auch Versuche mit vorbehandelten Schnitten an-  
gestellt. Die Schnitte wurden eine Zeit in reinen Zuckerlösungen gehalten,  
mit Filtrierpapier schnell getrocknet und dann in eine reine Säurelösung

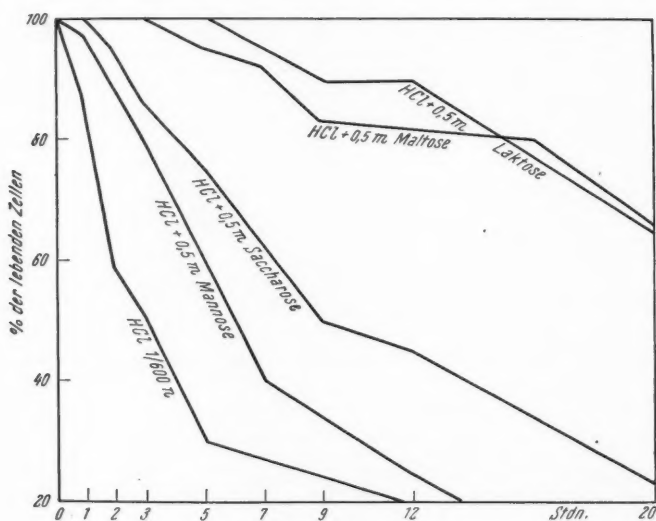


Abb. 1.

übergeführt. Solche vorbehandelten Schnitte weisen eine größere Resistenz  
gegen die Säure auf (s. Tab. 4). Um es in jeder der weiter folgenden Tabellen  
nicht stets zu wiederholen, sei hier darauf hingewiesen, daß die Zahlen in

allen Tabellen ein Durchschnittsprozents der lebenden Zellen aus je zehn Schnitten bedeuten.

Die Vorbehandlung der Schnitte mit den hypotonischen Zuckerlösungen weist eine deutliche a. W. gegen die Schwefelsäure auf (Tab. 4). Die Vor-

Tabelle 4.

*Viola tricolor*.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ca.  $1/500$  n; pH 4,6. Temp.  $19^\circ$ .

Einwirkungszeit der Lösungen	$\text{H}_2\text{SO}_4$ $1/500$ n (Kontrollv.)	Vorbehandelt 30 Minuten mit			
		Arabinose	Fructose	Maltose	Raffinose
		0,2 mol			
1 Stunde	100	100	100	100	100
2 Stunden	82	88	97	98	93
3 „	60	83	92	95	62
4 „	46	65	78	85	40
5 „	30	60	80	90	55
6 „	27	53	67	72	47
8 „	10	45	46	50	20
10 „	0	37	25	40	22
Mittelwert (%)	44	66	73	79	55

behandlung mit den beiden Monosen zeigt eine etwas kleinere Gegenwirkung als im Falle der Maltose. Das Trisaccharid Raffinose hat merkwürdigerweise in dieser Versuchsreihe eine viel schwächere a. W., als man erwarten konnte.

Tabelle 5.

Rotkohl.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ca.  $1/250$  n; pH 5,0. Temp.  $19^\circ$ .

Einwirkungszeit der Lösungen	$\text{H}_3\text{PO}_4$ $1/250$ n (Kontrollv.)	do + Saccharose			
		0,1 m	0,2 m	0,3 m	0,4 m
		pH 5,2		pH 5,3	pH 5,4
1 Stunde	100	100	100	100	100
2 Stunden	97	100	100	92	83
4 „	85	98	100	73	70
6 „	70	97	95	50	38
8,5 „	40	90	80	32	15
12 „	18	87	70	15	8
24 „	0	85	70	12	0
Mittelwert (%)	59	94	88	53	45

Die Saccharose wirkt gegen die Orthophosphorsäure in niedrigen, hypotonischen Konzentrationen ziemlich deutlich antagonistisch, während 0,3 mol keine a. W. aufweist. 0,4 mol Saccharose wirkt schon synergetisch. Hier sehen wir dasselbe Bild wie bei der Salzsäure (vgl. Tab. 1).

Ob bei den höheren Konzentrationen des Disaccharids, die hypertonisch sind, die Plasmolyse der Zellen auf die a. W. einen negativen Einfluß hat, ist ohne weiteres nicht klar. Dagegen spricht die Tatsache, daß in einigen Fällen die a. W. in hypertonischen Lösungen mit der Konzentration der Zucker fast parallel wächst.

### Einwertige organische Säuren

Tabelle 6.

Rotkohl. Essigsäure ca.  $\frac{1}{125} n$ ; pH 4,5. Temp. 20°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Essigsäure $\frac{1}{125} n$ (Kontrvers.)	do + Saccharose			
		0,05 m	0,1 m	0,3 m	0,5 m
		pH 4,6		pH 4,7	pH 4,8
1 Stunde	100	100	100	100	100
2 Stunden	90	100	100	100	90
3 „	75	90	97	92	80
5 „	12	45	87	82	78
6 „	5	25	42	40	70
7 „	0	13	20	35	63
8 „	0	0	5	32	42
Mittelwert (%)	40	53	64	69	75

Bei gleichen H-Ionenkonzentrationen ist Essigsäure für das Pflanzenplasma ebenso giftig wie eine Mineralsäure. Das beweist, daß bei der Plasmakoagulation durch Säuren nur die freien H-Ionen den Ausschlag geben und das Anion der Säure fast keine Bedeutung hat. In der vorliegen-

Tabelle 7.

Rotkohl. Essigsäure ca.  $\frac{1}{80} n$ ; pH 4,2. Temp. 19°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Essigsäure $\frac{1}{80} n$ (Kontrvers.)	do + Xylose		do + Gluk.	do + Sorbit
		0,2 m	0,5 m	0,2 m	0,5 m
		pH 4,3	pH 4,4		
1 Stunde	100	100	100	100	100
2 Stunden	95	97	100	97	95
3 „	40	90	85	88	95
4 „	17	78	25	27	83
5 „	8	65	15	20	72
6 „	0	53	10	13	65
Mittelwert (%)	43	81	56	58	85

den Versuchsserie (Tab. 6) hat die Saccharose eine kleinere a. W. gegen die Essigsäure, sie wird aber in stärkeren Zuckerlösungen größer.

Auch Xylose und Glukose sowie der sechswertige Alkohol Sorbit (Tab. 7) wirken gegen die Essigsäure antagonistisch.



In dieser Versuchsreihe finden wir keinen direkten Zusammenhang zwischen der Konzentration der Zucker und ihrer a. W. gegen die Säure. Xylose

Tabelle 8.

Rotkohl. Essigsäure ca.  $1/120$  n; pH 4,5. Temp. 19°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Essigsäure $1/120$ n (Kontrv.)	Vorbehandelt 15 Minuten mit					
		Glukose	Sorbit		Maltose		
		0,05 m	0,07 m	0,03 m	0,05 m	0,07 m	
1 Stunde	100	100	100	100	100	100	100
2 Stunden	80	100	100	100	100	100	100
3 "	45	92	100	98	93	90	97
4 "	30	78	92	85	88	82	87
5 "	15	65	87	77	72	67	80
6 "	0	15	57	30	32	25	20
7 "	0	5	17	18	12	10	15
Mittelwert (%)	39	65	79	72	71	68	71

0,2 m und Sorbit 0,5 m haben hier die beste Gegenwirkung, wobei bei der ersteren die Konzentration schwach hypotonisch, bei dem letzteren ausge-

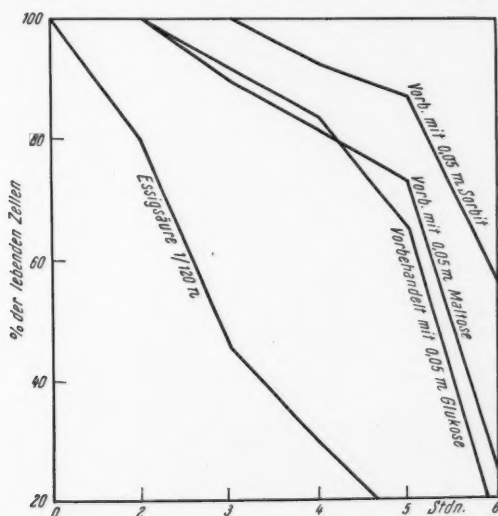


Abb. 2.

sprochen hypertonisch ist. Xylose 0,5 m und Glukose 0,2 m zeigen eine bedeutend kleinere a. W.

Eine kurze Vorbehandlung der Schnitte mit den hypotonischen Lösungen von Glukose, Maltose und Sorbit löst eine ziemlich starke a. W. gegen Essig-

säure aus (Tab. 8). Am besten wird sie durch Sorbit, ziemlich gut auch durch Glukose und Maltose ausgedrückt (s. Abb. 2).

Tabelle 9.

Rotkohl. Propionsäure ca.  $\frac{1}{100}$  n; pH 4,4. Temp. 20°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Propions. $\frac{1}{100}$ n (Kontrv.)	do + Laktose				do + Xyl.
		0,05 m	0,1 m	0,3 m	0,5 m	0,4 m
		pH 4,5		pH 4,6		pH 4,5
1 Stunde	100	100	100	100	100	100
2 Stunden	97	100	100	100	100	100
3 „	88	100	100	100	100	100
4 „	72	95	95	97	98	95
5 „	38	80	83	87	97	95
6 „	15	67	75	80	95	95
8 „	0	23	35	58	87	85
Mittelwert (%)	59	81	84	89	97	96

Tabelle 9 zeigt die a. W. der Laktose und Xylose gegen Propionsäure. Besonders deutlich zeigen die Versuche, daß die Gegenwirkung des Disaccharids mit der Erhöhung der Konzentration ganz regelmäßig wächst. Bemerkenswert in dieser Versuchsserie ist noch die Tatsache, daß Xylose 0,4 m eine ebenso starke a. W. wie Laktose 5,5 m aufweist.

Tabelle 10.

Rotkohl. Propionsäure ca.  $\frac{1}{100}$  n; pH 4,4. Temp. 20°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Propions. $\frac{1}{100}$ n (Kontrollv.)	do + Eryth.	do + Arabinose		do + Sorbose	
		0,5 m	0,1 m	0,5 m	0,1 m	0,5 m
		pH 4,6	pH 4,5	pH 4,6	pH 4,5	pH 4,6
2 Stunden	100	100	100	100	100	100
4 „	95	100	100	100	100	100
5 „	75	87	97	88	80	95
6 „	50	76	90	60	72	87
7 „	32	70	65	57	53	60
9 „	0	50	10	30	25	45
Mittelwert (%)	59	81	77	72	72	81

In dieser Versuchsserie (Tab. 10) ist die a. W. einer Pentose, Hexose und des vierwertigen Alkohols Erythrit gegen Propionsäure dargestellt. Alle drei Verbindungen zeigen eine ziemlich gute und annähernd gleiche Gegenwirkung gegen die Propionsäure.

Tabelle 11 zeigt eine vergleichende a. W. von Hexose, Disaccharid und Calciumchlorid. Die beiden Zucker weisen eine annähernd gleiche a. W.

gegen Propionsäure auf. Ca-Chlorid wirkt hier viel schwächer als die Zucker, die Schnitte sterben gleichzeitig mit den des Kontrollversuches ab, während sie in Gegenwart von Zuckern noch längere Zeit am Leben bleiben. Bemerkenswert ist das Verschwinden der freien H-Ionen in Gegenwart von

Tabelle 11.

Rotkohl. Propionsäure ca.  $\frac{1}{120}$  n; pH 4,5. Temp. 20°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Propions. $\frac{1}{120}$ n (Kontrollv.)	do + Fructose		do + Saccharose		do + CaCl <sub>2</sub>
		0,7 m	0,9 m	0,6 m	0,9 m	0,05 m
3 Stunden	100	100	100	100	100	100
6 "	78	100	100	90	98	90
7,5 "	53	100	100	90	95	90
9 "	18	97	98	80	95	65
10,5 "	15	90	95	73	90	50
12 "	5	82	96	60	88	35
21 "	0	60	70	35	85	0
Mittelwert (%)	38	90	94	75	90	61

Zuckern aus der Säurelösung (im Kontrollversuch pH 4,5, bei Saccharose 0,9 m pH 4,9!), wodurch die Säure bedeutend schwächer und damit für das Plasma weniger schädigend wird. Vielleicht einer der Gründe für die a. W. der Zucker!

Tabelle 12.

Rotkohl. Propionsäure ca.  $\frac{1}{120}$  n; pH 4,5. Temp. 18°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Propionsäure $\frac{1}{120}$ n (Kontrollv.)	Die Schnitte vorbehandelt 12 Stunden mit			
		Maltose			
		0,05 m	0,1 m	0,15 m	0,2 m
4 Stunden	100	100	100	100	100
6 "	95	100	100	100	100
8 "	82	100	100	98	95
10 "	60	80	83	90	88
12 "	17	52	80	87	80
15 "	0	55	27	50	55
Mittelwert (%)	59	81	82	87	86

Eine Vorbehandlung der Schnitte mit hypotonischen Maltoselösungen (0,05 m—0,2 m) gibt dem Plasma eine beachtliche Resistenz gegen Propionsäure (Tab. 12). Alle Maltoselösungen wirken hier ziemlich gleich.

Buttersäure gehört zu den schwachen Säuren, wie auch die ersten Glieder der homologen Reihe Essig- und Propionsäure. Im Verhalten des Protoplasmas gegen diese Säuren kommt es auf die freien H-Ionen an. In der vorliegenden Buttersäurelösung (pH 4,6) sterben die Schnitte in 8 Stunden

ab (Tab. 13). Die Zugabe von Saccharose verlängert das Leben der Zellen erheblich. Die a. W. des Disaccharids nimmt hier ganz regelmäßig mit dem Wachsen der Konzentration zu.

Tabelle 13.

Rotkohl. Buttersäure ca.  $\frac{1}{100}$  n; pH 4,6. Temp. 19°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Buttersäure $\frac{1}{100}$ n (Kontrollv.)	do + Saccharose				
		0,2 m	0,4 m	0,6 m	0,8 m	1,0 m
		pH 4,7		pH 4,8		
2 Stunden	100	100	100	100	100	100
4 „	82	92	100	100	100	100
5 „	35	95	100	100	100	100
6 „	18	92	97	100	100	100
7 „	15	80	85	100	100	100
8 „	0	68	82	87	98	100
10 „	0	45	80	93	97	100
22 „	0	0	55	82	93	97
32 „	0	0	17	42	57	95
Mittelwert (%)	28	64	81	89	94	99

Die Dauer der Vorbehandlung der Schnitte mit den Zuckerlösungen beeinflusst in einigen Fällen die spätere a. W. Die vorliegende Versuchsreihe (Tab. 14) zeigt, daß wenn die Schnitte 12 Stunden in Laktoselösungen

Tabelle 14.

Rotkohl. Buttersäure ca.  $\frac{1}{100}$  n; pH 4,6. Temp. 20°.

Die Schnitte wurden mit Laktose 12 Stunden, 1 Stunde und 15 Minuten vorbehandelt.

Einwirkungszeit der Lösungen	Butters. $\frac{1}{100}$ n (Kontrv.)	Die Schnitte in Laktoselösungen gehalten					
		12 Stunden		1 Stunde		15 Minuten	
		0,05 m	0,1 m	0,05 m	0,1 m	0,05 m	0,1 m
4 Stunden	100	100	100	100	100	100	100
6 „	95	82	95	98	100	100	100
8 „	45	42	43	92	93	95	95
10 „	7	9	17	53	27	82	45
11 „	0	0	0	33	10	60	40
Mittelwert (%)	49	47	51	75	66	87	76

gelegen hatten, sie dann später gegen Buttersäure keine erhöhte Resistenz haben. Nach einer kürzeren Vorbehandlung (1 Std. bis 15 Min.) dagegen werden die Zellen gegen die Säure ziemlich widerstandsfähig. Die verwendeten Laktoselösungen sind hypotonisch und haben in allen drei Fällen die gleichen Konzentrationen.

Aus der homologen Reihe der einwertigen Säuren wurden zuletzt noch bei den Versuchen Valerian- und Iso-Valeriansäure verwendet.

Tabelle 15.

Rotkohl. Valeriansäure ca.  $1/100$  n; pH 4,8. Temp. 18°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Valerian- säure $1/100$ n (Kontrv.)	do + Glukose				do + Saccharose	
		0,2 m	0,4 m	0,6 m	0,8 m	0,4 m	0,6 m
		pH 4,8				pH 5,0	
1 Stunde	100	100	100	100	100	100	100
2 Stunden	97	100	100	98	95	100	100
3 „	97	100	100	100	97	100	100
4 „	70	190	100	100	95	100	100
5 „	45	95	100	95	95	98	100
6 „	15	95	100	100	98	97	100
7 „	0	87	95	97	95	98	100
10 „	0	80	93	98	95	98	100
20 „	0	0	42	60	75	82	83
Mittelwert (%)	45	84	92	94	94	97	98

Gegen die Valeriansäure, die für das Plasma ebenso giftig wie die bereits untersuchten einwertigen Säuren ist, wirken Glukose und Saccharose beachtenswert antagonistisch (Tab. 15). Es scheint mir, daß mit der Vergröße-

Tabelle 16.

Rotkohl. Iso-Valeriansäure ca.  $1/125$  n; pH 4,6. Temp. 19°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Iso-Val- eriansäure $1/125$ n (Kontrv.)	do + Laktose		do + Maltose		do + Saccharose	
		0,05 m	0,5 m	0,05 m	0,5 m	0,05 m	0,5 m
2 Stunden	100	100	100	100	100	100	100
3 „	87	100	100	100	100	100	100
4 „	75	100	100	100	100	100	100
5 „	38	97	100	100	100	100	100
6 „	20	95	100	100	100	78	88
7 „	0	97	100	100	100	72	85
9 „	0	72	98	97	95	65	80
11 „	0	90	98	95	95	60	75
23 „	0	48	95	18	97	0	85
Mittelwert (%)	36	89	99	90	98	75	90

rung des Kohlenstoffkomplexes bei den organischen Säuren das Eindringen in die Zellen durch die Zucker immer mehr und mehr erschwert und dadurch die a. W. der Mono- und Disaccharide größer wird.

In der Tabelle 16 ist die a. W. der drei Disaccharide gegen die Iso-Valeriansäure dargestellt. Jedes Disaccharid hat zwei Konzentrationen: eine

sehr niedrige und eine zehnmal höhere. Die Zucker haben gegen die Säure eine bedeutende a. W., die bei den höheren Konzentrationen verhältnis-

Tab. 17. *Zweiwertige organische Säuren.*  
*Viola tricolor.* Oxalsäure ca.  $\frac{1}{500}$  n; pH 4,6. Temp. 21°

Einwirkungszeit der Lösungen	Oxalsäure $\frac{1}{500}$ n (Kontrollv.)	do + Arabin.	do + Glukose	do + Maltose	do + Raff.
		0,5 m		0,3 m	
		pH 4,6		pH 4,7	
30 Minuten	95	100	100	100	100
1 Stunde	60	95	100	100	100
1,5 Stunden	43	95	100	100	100
2 „	25	87	100	100	100
2,5 „	15	76	92	100	93
3 „	12	65	90	100	92
4 „	0	57	85	97	90
5 „	0	43	60	95	70
6 „	0	20	42	80	48
7,5 „	0	0	33	65	25
Mittelwert (%)	25	64	80	94	82

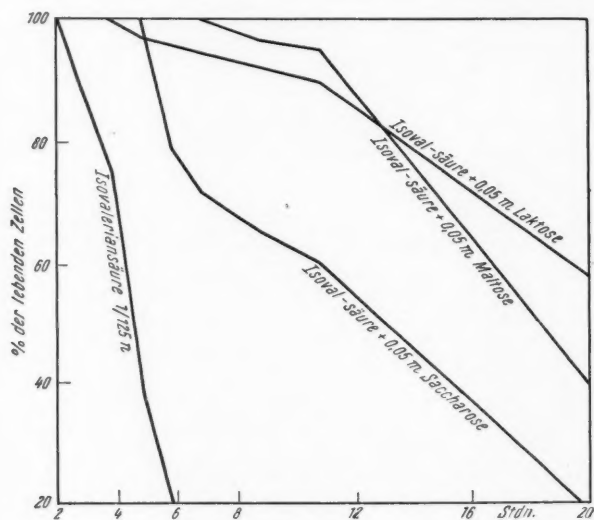


Abb. 3.

mäßig größer ist. In der vorliegenden Versuchsserie haben die Laktose und die Maltose eine ungefähr gleiche a. W., die Saccharose aber eine etwas schwächere (s. auch die Abb. 3).



Die Oxalsäure ist im allgemeinen für das Pflanzenplasma giftiger als die untersuchten einwertigen organischen Säuren. Eine a. W. der Zucker

Tabelle 18.

Rotkohl. Malonsäure ca.  $\frac{1}{200}$  n; pH 4,6. Temp. 20°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Malons. $\frac{1}{200}$ n (Kontrv.)	do + Maltose			do + Laktose		
		0,3 m	0,5 m	0,7 m	0,3 m	0,5 m	0,7 m
2 Stunden	85	100	100	100	85	67	95
4 „	72	95	100	100	35	20	52
6 „	20	82	97	98	25	32	45
8 „	6	80	98	98	10	25	50
10 „	0	80	97	97	5	15	32
13 „	0	25	92	92	0	0	15
22 „	0	0	52	73	0	0	0
Mittelwert (%)	25	66	91	94	26	23	41

zeigt sich nur bei geeigneten Säure- und Zuckerkonzentrationen (Tab. 17). Obwohl hier eine schwache Konzentration der Oxalsäure verwendet wurde (pH 4,6), starben die Schnitte in der reinen Säure schon in 4 Stunden ab. In

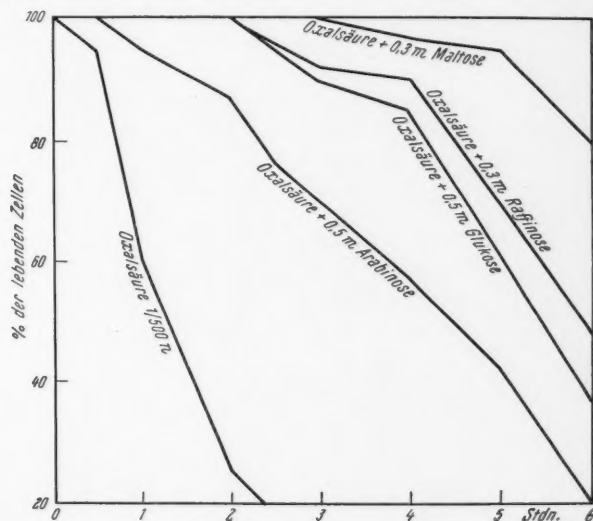


Abb. 4.

Gegenwart von Pentose, Hexose, Di- und Trisaccharid leben die Schnitte bedeutend länger. Die a. W. dieser Zucker nimmt nach der folgenden Reihenfolge zu: Arabinose < Glukose, Raffinose < Maltose.

Das in der Reihe der zweibasischen Säuren folgende Homolog ist die Malonsäure. Sie ist eine schwache Säure: bei der Dissoziation wird zuerst nur ein H-Ion abgesondert, so daß das Dissoziationsgleichgewicht von gleicher Art wie bei Essigsäure ist (Walker 1921). Dessenungeachtet ist die

Tabelle 19.

Rotkohl. Bernsteinsäure ca.  $\frac{1}{30}$  n; pH 4,0. Temp. 20°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Bernstein- säure $\frac{1}{30}$ n (Kontrv.)	do + Laktose					
		0,03 m	0,05 m	0,07 m	0,09 m	0,2 m	0,5 m
		pH 4,2				pH 4,3	
2 Stunden	100	100	100	100	100	100	70
4 „	85	92	80	75	95	90	22
5 „	52	40	67	45	32	65	23
6 „	17	42	47	20	37	12	20
7 „	0	20	28	17	35	0	12
9 „	0	12	22	13	10	0	0
Mittelwert (%)	43	51	57	45	51	44	24

Malonsäure für das Pflanzenplasma nicht weniger als die Oxalsäure giftig. In der vorliegenden Versuchsserie (Tab. 18) hat die Maltose gegen die Säure eine beachtliche a. W., die mit der Erhöhung der Konzentration des Disaccharids zunimmt. Die Laktose hat eine schwächere Gegenwirkung nur in hoher Konzentration. — Bemerkenswert in dieser Serie ist noch das starke

Tabelle 20.

Rotkohl. Adipinsäure ca.  $\frac{1}{115}$  n; pH 4,4. Temp. 20°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Adipin- säure $\frac{1}{115}$ n (Kontrv.)	do + Saccharose					
		0,03 m	0,06 m	0,1 m	0,2 m	0,4 m	0,8 m
		pH 4,5	pH 4,6	pH 4,7		pH 4,8	
3 Stunden	100	100	100	100	100	67	60
5 „	85	95	92	95	95	55	52
6 „	50	80	75	87	92	22	23
7 „	17	35	67	75	77	2	7
8 „	0	17	30	47	60	0	0
Mittelwert (%)	50	65	73	81	85	29	28

Verschwanden der freien H-Ionen in Gegenwart von Zuckern 0,5 und 0,7 mol, die pH 5,0 bzw. 5,1 gegen die pH 4,6 im Kontrollversuch haben. Daß dadurch die Säure schwächer und weniger giftig für das Plasma wird, ist selbstverständlich. Dagegen Laktose 0,5 m (pH 5,0) hat gegen Malonsäure überhaupt keine a. W. Daraus kann man schließen, daß die Verminderung der freien H-Ionen in der Lösung nicht der einzige Grund für die a. W. ist.

Die Laktose hat in dieser Versuchsreihe (Tab. 19) eine schwache a. W., die nur bei der niedrigen Konzentration des Disaccharids (0,05 m) deutlich

Tabelle 21.

*Viola tricolor*. Äpfelsäure ca.  $\frac{1}{250}$  n; pH 4,6. Temp. 19°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Äpfelsäure $\frac{1}{250}$ n (Kontrollv.)	do + Erythrit		do + Mannit	
		0,3 m	0,5 m	0,3 m	0,5 m
30 Minuten	100	100	100	100	100
1 Stunde	95	100	100	100	100
2 Stunden	80	100	100	100	100
3 „	70	92	100	100	100
4 „	60	80	98	95	100
5,5 „	50	75	90	92	100
7 „	30	68	85	87	97
8 „	25	55	67	68	90
9,5 „	0	40	55	62	85
11 „	0	15	47	60	85
Mittelwert (%)	51	72	84	85	95

auftritt. Die stärkeren Lösungen haben keine a. W. Die 0,5 m Laktose zeigt sogar eine ziemlich deutliche synergetische Wirkung.

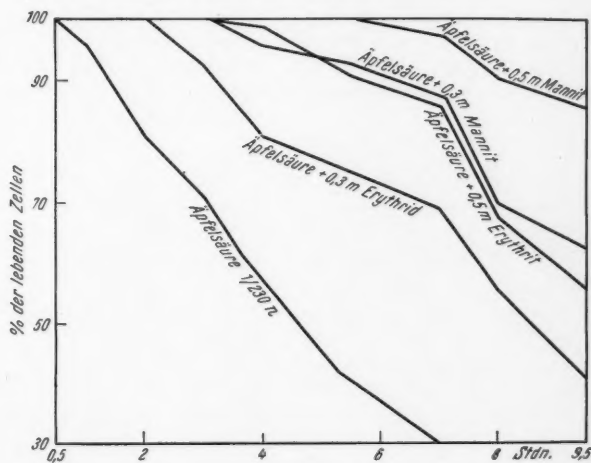


Abb. 5.

Die Saccharose zeigt gegen die Adipinsäure a. W. nur bei niedrigen, hypotonischen Konzentrationen des Zuckers (Tab. 20). Die Gegenwirkung des Disaccharids nimmt von 0,03 bis 0,2 mol regelmäßig zu, um dann von 0,4 bis 0,8 mol in die synergetische Wirkung umzuschlagen.

Es ist merkwürdig, daß Äpfelsäure schon in sehr schwacher Konzentration für das Pflanzenplasma giftig ist, ungeachtet dessen, daß sie zu den verbreiteten Pflanzensäuren gehört. In einem reifen Eßapfel ist diese Oxy-säure von ungefähr  $1/25$  n (pH ca. 3,0). Eine fast zehnmal schwächere Lösung

Tabelle 22.

Rotkohl. Weinsäure ca.  $1/125$  n; pH 4,8.  
Weinsäure ca.  $1/175$  n; pH 4,4. Temp. 18°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Wein- säure $1/225$ n (Kontrv.)	do + Saccharose			Wein- säure $1/175$ n (Kontrv.)	do + Maltose		do + CaCl <sub>2</sub>
		0,05 m	0,1 m	0,2 m		0,1 m	0,3 m	0,05 m
		pH 5,0		pH 5,1		pH 4,5	pH 4,6	pH 4,4
1 Stunde	100	100	100	100	100	100	100	100
2 Stunden	95	100	100	70	92	95	62	100
3 „	82	90	80	55	63	85	15	83
4 „	58	60	52	30	40	80	0	62
5 „	—	—	—	—	8	52	0	52
6 „	25	32	38	18	0	45	0	50
7,5 „	15	30	25	12	—	—	—	—
9 „	0	20	15	0	—	—	—	—
Mittw.(%)	53	62	59	41	50	76	30	75

tötet die Zellen der Blütenblätter von *Viola* in 9 Stunden ab (Tab. 21). Wahrscheinlich wird die schädigende Wirkung dieser Säure im Obst in Gegenwart von Zuckern abgeschwächt. Wie man aus den Versuchen der Tabelle 21 sieht, erweist sich schon der vierwertige Alkohol Erythrit gegen

Tabelle 23.

Rotkohl. Citronensäure ca.  $1/40$  n; pH 3,7. Temp. 19°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Citronen- säure $1/40$ n (Kontrv.)	do + Maltose		do + Laktose		do+Frukt.	do+Arab.
		0,5 m	0,7 m	0,5 m	0,7 m	0,7 m	0,7 m
		pH 3,9	pH 4,0	pH 3,0	pH 4,0	pH 3,9	
1 Stunde	100	100	100	100	100	100	100
1,5 Stunden	62	85	75	70	72	57	65
2 „	22	60	45	42	58	15	20
2,5 „	10	48	36	38	35	5	8
3 „	0	43	28	35	25	0	0
4 „	0	35	20	18	10	0	0
Mittelwert (%)	31	62	51	50	50	29	32

Äpfelsäure als antagonistisch wirksam. Beim Mannit ist diese Wirkung noch ausgeprägter (s. Abb. 5).

Aus der Tabelle 22 sehen wir, daß Weinsäure genau so giftig für das Pflanzenplasma wie Äpfelsäure ist (eine süße Traube hat pH ca. 3,0).

Disaccharide wirken gegen diese Säure nur in schwachen Lösungen antagonistisch, in stärkeren wirken sie synergetisch. Zum Vergleich ist es interessant zu bemerken, daß die 0,1 m Maltose etwa dieselbe a. W. gegen Weinsäure wie das 0,05 m Ca-Chlorid hat.

Die Citronensäure gehört auch zu den giftigen Pflanzensäuren. Maltose und Laktose wirken in stärkeren Lösungen ziemlich mäßig antagonistisch.

Tabelle 24.

Rotkohl. Zitronensaft 1 : 150 H<sub>2</sub>O; pH 4,6.

*Viola tricolor*. Zitronensaft 1 : 200 H<sub>2</sub>O.

Einwirkungszeit der Lösungen	Zitronen- saft 1 : 150 H <sub>2</sub> O (Kontrollv.)	do + Maltose			Zitronen- saft 1 : 200 H <sub>2</sub> O (Kontrollv.)	do + Mannit 0,5 m pH 4,7
		0,1 m	0,3 m	0,5 m		
		pH 4,6	pH 4,7	pH 4,8		
1 Stunde	100	100	100	100	100	100
2 Stunden	100	100	100	100	87	98
3 „	97	100	100	100	78	92
4 „	95	100	100	100	62	85
5 „	90	100	100	100	40	77
6 „	87	100	100	100	20	72
7,5 „	52	100	100	100	17	63
11 „	30	98	100	100	15	55
12,5 „	10	95	100	100	0	60
14 „	0	97	100	100	0	58
24 „	0	60	95	100	—	—
Mittelwert (%)	60	95	99	100	42	76

Fruktose und Arabinose erwiesen sich in dieser Versuchsserie als unwirksam (Tab. 23).

Ich habe auch Versuche mit dem gepreßten Saft einer gekauften Zitrone angestellt. Der ausgepreßte Zellsaft (pH 1,5!) tötete die Rotkohlzellen innerhalb weniger Minuten ab. Alle Zellen wurden stark rot. Man konnte das Eindringen der Säure von Zelle zu Zelle gut beobachten. Es wurden zunächst Versuche mit durch dest. H<sub>2</sub>O zehnmal verdünntem Zitronensaft (pH 3,0) gemacht. In ungefähr 30 Minuten waren alle Zellen tot. Nach mehreren Vorversuchen wurden dann zwei Versuchsreihen mit verdünntem Zitronensaft angestellt: 1. Mit Rotkohlschnitten und Zitronensaft 1 : 150 H<sub>2</sub>O, 2. mit *Viola*-Schnitten und Zitronensaft 1 : 200 H<sub>2</sub>O.

Die Ergebnisse der Versuche mit Zitronensaft sind interessant. Rotkohlschnitte, die verhältnismäßig resistent gegen Chemikalien sind, sterben im Zitronensaft 1 : 150 H<sub>2</sub>O nach 14 Stunden ab (Tab. 24). In Gegenwart von Maltose sind sie nach 24 Stunden fast alle noch am Leben. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß der Zellsaft einer Pflanze auf die Zellen einer anderen, sonst widerstandsfähigen Pflanze in so großer Verdünnung noch tödlich wirkt. Die Blütenblätter von *Viola* sind nicht so resistent, und es ist verständlich, daß sie etwas früher und in einer noch schwächeren Zitronensaft-

lösung absterben. Das Mannit, dessen a. W. etwa der einen Hexose gleichkommt, wirkt gegen den Zitronensaft ziemlich intensiv antagonistisch. Es sei noch hinzugefügt, daß die a. W. der Zucker beim Zitronensaft mehr zum Vorschein kommt als bei der reinen Citronensäure.

Tabelle 25.

Rotkohl. Monochloressigsäure ca.  $\frac{1}{225}$  n; pH 4,6.

Trichloressigsäure ca.  $\frac{1}{200}$  n; pH 4,4. Temp. 20°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Mono- chlor- essigsäure $\frac{1}{135}$ n (Kontr.)	do + Xylose				Tri- chlor- essigsäure $\frac{1}{200}$ n (Kontr.)	do + Laktose		
		0,1 m	0,2 m	0,3 m	0,5 m		0,1 m	0,2 m	0,3 m
		pH 4,7		pH 4,8					
1 Stunde	—	—	—	—	—	100	100	100	100
2 Stunden	100	100	100	100	100	100	100	100	88
3 „	90	98	100	100	100	92	95	83	55
4 „	82	95	98	95	97	60	92	87	38
5 „	20	50	65	85	25	35	65	55	17
6 „	0	13	12	28	0	17	52	48	15
7 „	—	—	—	—	—	0	43	40	0
Mittw.(%)	58	71	75	81	64	58	78	73	45

Bei gleicher molekularer Konzentration sind Mono- und Trichloressigsäure für das Pflanzenplasma viel giftiger als gewöhnliche Essigsäure.

In der vorliegenden Versuchsreihe (Tab. 25) wirkt die Xylose gegen die

Tabelle 26.

Rotkohl. Benzoesäure ca.  $\frac{1}{500}$  n; pH 4,7. Temp. 18°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Benzoe- säure $\frac{1}{500}$ n (Kontrv.)	do + Xylose		do + Mann.	do + Malt.	do + Raff.
		0,1 m	0,3 m	0,1 m	0,1 m	0,1 m
		pH 4,8	pH 4,8	pH 5,0		
1 Stunde	100	100	100	100	100	100
2 Stunden	80	100	100	100	100	100
3 „	52	100	100	100	100	100
4 „	37	100	100	100	100	100
5 „	20	100	90	100	100	100
6 „	0	80	83	90	92	93
7 „	0	50	75	87	74	85
8 „	0	37	50	72	53	48
Mittelwert (%)	36	83	87	94	90	91

Monochloressigsäure schwach antagonistisch. Die beste Gegenwirkung liegt in mittleren Konzentrationen, ungefähr bei der plasmolytischen Grenzkonzentration. Sehr ähnlich ist die a. W. der Laktose gegen die Trichloressigsäure. Stärkere Lösungen des Disaccharids wirken synergetisch.



Die Giftigkeit der Benzoesäure in bezug auf das Pflanzenplasma kann man mit der der stärksten Mineralsäuren, wie Salz- und Schwefelsäure, vergleichen. Wie die Tabelle 26 zeigt, wirken alle Zucker gegen die Säure wesentlich stärker antagonistisch. Während in reiner Säure alle nach 5 Stun-

Tabelle 27.

Rotkohl. Salicylsäure ca.  $\frac{1}{400}$  n; pH 4,8. Temp. 19°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Salicylsäure $\frac{1}{400}$ n (Kontrv.)	do + Erythrit	do + Mannit	do + Sorbit	do + Sorbose	do + Saccharose
		Alle Zucker 0,1 mol				
1 Stunde	100	100	100	100	100	100
2 Stunden	90	100	100	100	100	100
2,5 „	57	100	100	100	100	100
3 „	28	95	100	97	100	90
3,5 „	15	92	97	95	98	87
4 „	0	80	97	95	97	73
6 „	0	82	83	82	95	50
8 „	0	38	40	76	70	10
Mittelwert (%)	36	86	90	93	95	75

den stark beschädigten Zellen abzusterben beginnen, sind in Gegenwart einer schwachen Konzentration von Xylose, Mannose, Maltose und Raffinose von sechs Fällen bei fünf die Schnitte 100prozentig intakt und in einem Falle 90% am Leben.

Tabelle 28.

Rotkohl. Glutaminsäure ca.  $\frac{1}{100}$  n; pH 4,4. Temp. 19°.

Einwirkungszeit der Lösungen	Glutamin- säure $\frac{1}{100}$ n (Kontrollv.)	do + Sorbit		do + Sorbose		do + Maltose
		0,1 m	0,2 m	0,1 m	0,2 m	0,1 m
2 Stunden	100	100	100	100	100	100
3 „	85	95	78	90	83	88
4 „	87	92	95	90	93	80
6 „	78	90	70	90	75	70
8 „	67	75	78	80	77	60
11 „	45	52	55	80	65	38
12,5 „	40	45	43	70	52	25
14 „	30	47	23	60	50	20
Mittelwert (%)	66	74	68	82	74	60

Es scheint uns, daß der Benzolring das Eindringen dieser Säure in Gegenwart von Zuckern erschwert.

Salicylsäure ist ein etwas stärkeres Plasmagift als Benzoesäure. In einer Säurelösung von pH 4,8 starben schon alle Rotkohlzellen in 4 Stunden ab.

In dieser Versuchsreihe wirken die drei mehrwertigen Alkohole gegen die Salicylsäure ziemlich stark antagonistisch (Tab. 27), das vierwertige Erythrit etwas schwächer als die beiden sechswertigen Alkohole. Es ist auch bemerkenswert, daß die a. W. der Saccharose schwächer als die der Sorbose ist. Aller Wahrscheinlichkeit nach wird auch in diesen Versuchen das Eindringen der Säure in die Zellen in Gegenwart von Zuckern durch den Benzolring erschwert.

Zuletzt wurden einige Versuche mit Glutaminsäure angestellt. Diese  $\alpha$ -Aminosäure ist in der Pflanzenwelt verbreitet und kommt häufig in Sameneiweiß vor. Sie ist für das Pflanzenplasma wenig giftig, vermutlich wegen ihres amphoteren Charakters. Während in den meisten an- und organischen Säuren bei pH 4,4 alle Zellen nach ca. 5–7 Stunden abstarben, sind in der Glutaminsäure bei derselben H-Ionenkonzentration nach Ablauf dieser Zeit noch ca. 75% der Zellen intakt (Tab. 28). Wenn wir von der schwachen und nicht ganz stabilen a. W. der Sorbose (0,1 m) absehen, so ist in allen anderen Fällen die a. W. im Bereich des Versuchsfehlers.

### Schlußbemerkungen

Aus allen oben dargestellten Versuchen läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß die Mono- und Disaccharide, das Trisaccharid Raffinose sowie die mehrwertigen Alkohole gegen Säuren mehr oder weniger antagonistisch wirken. Was die einzelnen Zuckergruppen betrifft, so scheint es, daß in einigen Fällen die Disaccharide eine etwas stärkere a. W. als Monosaccharide gegen die Säuren aufweisen. Da aber bei der langsam fortschreitenden Inversion in den Säure-Disaccharid-Gemischen die abgespaltenen Monosaccharide nicht ohne Einfluß auf das Endresultat sind und ferner, im ganzen gesehen, große Schwankungen in den Zuckerwirkungen auftreten, so ist es ohne weiteres nicht möglich, in einem jeden neuen Versuch die Überlegenheit der a. W. eines Disaccharids der eines Monosaccharids voraussetzen zu können.

Die Tatsache der a. W. der Zucker gegen Säuren ist durch einen einfachen Versuch festzustellen. Legt man einen Rotkohlschnitt unter dem Mikroskop in eine Säure (am besten 0,15–0,2 n Essigsäure), so kann man durch den Farbumschlag beobachten, wie die Säure zuerst in die Randzellen eindringt. Es bildet sich ein roter Saum, der ziemlich schnell an Breite zunimmt, bis zuletzt die ganze Fläche des Schnittes rot wird. Man sieht deutlich, wie die Säure in die Zellen eindringt. Die roten Zellen sterben auch gleich ab. Ihr Inhalt wird völlig zerstört. Ein ganz anderes Bild zeigt sich uns, wenn der Säure mit einer Messerspitze etwas Rohrzucker zugefügt worden ist. Der rote Saum hebt sich nicht so scharf von der anderen Schnittfläche ab und nimmt viel langsamer zu. Ersetzt man die Säure mit einem ausgeglichenen Plasmolytikum (1–1,5 mol), so sieht man, daß der größte Teil des Schnittes gut plasmolysiert, während im Schnitt ohne Zucker nur Zellwände übrig geblieben sind. Um besser vergleichen zu können, führt man diesen Versuch gleichzeitig auf zwei oder auf ein und demselben Objektträger durch. Diese Beobachtung zeigt, daß Zucker das Eindringen der Säure in die Zellen bis zu einem gewissen Grade verhindert.

Ein analoges Verhalten der Zellen zeigt sich auch in den Gemischen von Neutralsalzen und Zuckern.

Der Grund der a. W. der Zucker und mehrwertigen Alkohole ist in beiden Fällen derselbe, und zwar, daß sie

1. die Permeabilität der Zellen für Säuren bzw. Neutralsalze herabsetzen. Es permeiert weniger Säure in die Zellen, und dadurch wird die schädigende Wirkung vermindert.

2. Die Zucker und mehrwertigen Alkohole bewirken eine Verfestigung der Oberflächenschicht des Protoplasmas, wodurch die Permeabilität für Säuren herabgesetzt wird.

3. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Zahl der OH-Gruppen und der a. W. der Zucker und Alkohole in dem Sinne, daß mit der Vergrößerung der Zahl der OH-Gruppen in den antagonistisch wirkenden Stoffen auch die a. W. gegen Säuren größer wird. So hat z. B. sechswertiger Alkohol Mannit eine größere Gegenwirkung als vierwertiger Erythrit (vgl. Tab. 21).

Ein schlagender Beweis dafür, daß die Zucker die Oberflächenschicht des Plasmas vermutlich durch die Dehydratation der Plasmalipide auf der Oberfläche des Plasmas verdichten und infolgedessen die Permeabilität für Säuren herabsetzen, wird durch die Vorbehandlung der Schnitte mit Zuckerlösung erbracht.

Es ist möglich, dies auch makroskopisch zu demonstrieren.

Feingeschnittene und gut gewaschene Stücke von Rotkohlblatt werden in zwei Portionen geteilt: die eine wird auf 30 Minuten in 10%ige Rohrzuckerlösung gelegt, die andere feucht gehalten. Die erste Portion wird dann auf 15 Minuten in Wasser übergeführt<sup>2</sup> (Deplasmolyse), und nachdem werden die beiden Portionen in  $\frac{1}{20}$  n Essigsäure gelegt. Man kann bei diesem Versuch Probiergläser benutzen. Nach einiger Zeit sehen wir, daß die Säure der Kontrollportion sich rot färbt (einmal leicht schütteln), während die der vorbehandelten Schnitte nur einen leichten roten Schimmer hat.

Man kann noch eine dritte Portion, die 10% Zucker in der Säure enthält, mit anstellen. Sie bleibt ziemlich lange farblos. Die Plasmolyse in 10%iger Zuckerlösung und Deplasmolyse in Wasser sind für die Kohlblattzellen bei dieser Vorbehandlung ziemlich schwer schädigende Momente. Trotzdem bleiben sie aber länger als die der Kontrollportion am Leben.

Durch Übertragen der Schnitte aus der Zuckerlösung in Wasser werden auch die Spuren des Zuckers ausgewaschen. Das viel langsamere Eindringen der Säure nach der Behandlung ist allein auf die Verfestigung der Plasmaoberfläche zurückzuführen. Vollkommen zurückgehalten wird die Säure durch den Zucker aber nicht.

Ich habe aus den Versuchen den Eindruck gewonnen, daß organische Säuren, die einen größeren Kohlenstoffkomplex haben (eine längere Kohlenstoffkette, Benzolring etc.), bei geeigneten Versuchsbedingungen durch Antagonistika etwas mehr am Eindringen zurückgehalten werden als diejenigen, die eine kürzere Kohlenstoffkette besitzen.

Wie die Essigsäure ( $\frac{1}{150}$  n) in Gegenwart von Laktose in die Zellen der Blütenblätter von *Viola* eindringt, zeigt die Tabelle 29. Die Zahlen in dieser

<sup>2</sup> Als plasmolyisierte Schnitte würden sie die Säure einsaugen.

Tabelle geben den Prozentsatz der Zellen in zehn Schnitten an, in welche die Säure bereits eingedrungen ist.

Tabelle 29.  
*Viola tricolor*. Essigsäure ca.  $\frac{1}{150}$  n; pH 4,6 Temp. 19°.

Nach	Essigsäure $\frac{1}{150}$ n (Kontrollvers.) %	do + Laktose		
		0,1 m %	0,3 m %	0,5 m %
30 Minuten	20	0	0	0
60 „	35	5	0	0
90 „	60	10	3	0
120 „	78	15	8	3
150 „	90	30	20	5
180 „	100	48	32	20

Freie H-Ionen der Säure sind sehr aktiv und dringen, wenn auch langsam, durch die verfestigte Zelloberfläche doch allmählich ein (s. Abb. 6). Die Zellen besitzen eine ziemlich verschiedene Widerstandsfähigkeit gegen eine schwache Säure.

In einige Zellen dringt sie früher, in andere viel später ein. Die Kurve des

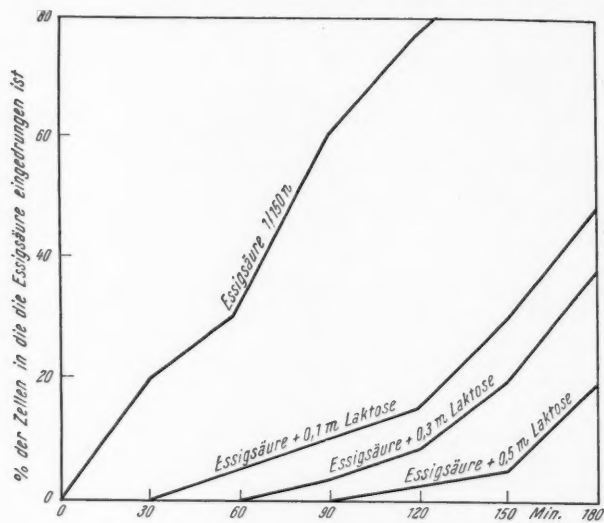


Abb. 6.

Kontrollversuch zeigt, daß Essigsäure in gleichen Zeiteinheiten in die etwa gleiche Zahl von Zellen eindringt. In Gegenwart von Laktose geht die Intensität des Eindringens stark zurück: bei 0,5 m Laktose stärker als bei 0,1 m. Mit der Zeit überwinden die H-Ionen mehr und mehr den Widerstand der Plasmamembran und dringen in eine größere Zahl von Zellen ein, die dadurch stark geschädigt werden. Die Laktosekurven biegen sich infolgedessen nach oben. Bei einer Fortsetzung des Versuches würden sie der Kontrollkurve immer näher kommen.

In Zucker-Säure-Gemischen tritt ein physikalisch-chemischer Prozeß regelmäßig in Erscheinung, der noch einer besonderen Erwähnung bedarf.

In Gegenwart von Zuckern nimmt die Zahl der freien H-Ionen stets ab. Ob es sich hier um eine Zurückdrängung der Dissoziation der Säuren oder eine Bildung einer Verbindung handelt, läßt sich auf Grund dieser Ergebnisse nicht sagen. Jedenfalls ist der pH-Wert in Gemischen fast immer etwas größer als in Säure allein. So z. B. hat die Orthophosphorsäure 0,004 *n* pH 5,0 (39%). In den Mischungen mit Saccharose: mit 0,1 mol pH 5,2 (6%); 0,2 mol pH 5,2 (12%); 0,3 mol pH 5,3 (47%). In Klammern ist das Mittelprozent der in 24 Stunden abgestorbenen Rotkohlzellen angegeben. Wir sehen daraus, daß mit der Vergrößerung der zugesetzten Zuckermenge die Zahl der freien H-Ionen sich mehr und mehr verringert.

Da gerade die H-Ionen das Plasma angreifen und zur Koagulation bringen, so könnte man daraus schließen, daß hierin einer der Hauptgründe der a. W. des Zuckers besteht. Dieses trifft aber nicht gänzlich zu. Wie die Zahlen in den Klammern zeigen, ist die Grenzkonzentration der a. W. des Zuckers im vorliegenden Versuch 0,2 mol. Über diese Konzentration hinaus wirkt das Disaccharid schon synergetisch. Die plasmolytische Grenzkonzentration der Rotkohlzellen liegt bei ca. 0,2–0,3 mol Saccharose. Der schädigende Einfluß einer länger dauernden Plasmolyse ist gut bekannt. Vielleicht ist die synergetische Wirkung des Zuckers doch in der Plasmolyse zu suchen. Es kommen aber Fälle vor, in denen 0,5 mol und noch höhere Konzentrationen der Zucker gegen die Säuren deutlich antagonistisch wirken.

### Kurze Zusammenfassung

1. Es wurde die antagonistische Wirkung einiger Zucker und mehrwertiger Alkohole gegen Mineral- und organische Säuren beim Pflanzenplasma untersucht.

2. Als Versuchsobjekte dienten Blattflächenschnitte von Rotkohl und *Rhoeo discolor* sowie Schnitte der Blütenblätter von *Viola tricolor*.

3. Als Säuren wurden verwendet: Salz-, Schwefel- und Orthophosphorsäure. Von einwertigen organischen Säuren kamen zu Verwendung: Essig-, Propion-, Butter-, Valerian- und Iso-Valeriansäure; von zweiwertigen Säuren: Oxal-, Malon-, Bernstein- und Adipinsäure sowie die Oxyssäuren: Äpfel-, Wein- und die dreiwertige Citronensäure; aus aromatischen Säuren: Benzoe- und Salicylsäure, aus Aminosäuren Glutaminsäure, mit einer durchschnittlichen pH von ca. 4,5–4,6.

4. Als antagonistisch wirkende Stoffe wurden verwendet: Xylose, Arabinose, Glukose, Fruktose, Mannose, Sorbose, Saccharose, Maltose, Laktose, Raffinose, Erythrit, Mannit und Sorbit mit einer Konzentration von 0,03 bis 0,8 mol.

5. Alle obengenannten Stoffe wirken bei geeigneten Versuchsbedingungen bis zu einem gewissen Grade der plasmachädigenden Wirkung der schwachen Säurewirkung entgegen. Sie setzen die Permeabilität des Plasmas für die Säuren herab, indem sie die Plasmaoberfläche verdichten, vermut-

lich durch die Dehydratation der Plasmaphosphatide und die Säuren am Eindringen verhindern.

6. Die Verfestigung der Plasmaoberfläche durch die Zucker und mehrwertigen Alkohole steht im Zusammenhang mit den OH-Gruppen dieser Stoffe. Die antagonistische Wirkung gegen Säuren kommt zuerst bei Erythrit (4OH-Gruppen) zum Ausdruck. Glycerin wirkt mit Säuren noch synergistisch.

Der Forschungsgemeinschaft der deutschen Wissenschaft, durch deren freundliche Unterstützung die vorliegende Arbeit ermöglicht wurde, spreche ich an dieser Stelle meinen tiefempfundenen Dank aus.

Mein herzlicher Dank gebührt auch Herrn Professor Dr. W. Mevius, Direktor des Staatsinstituts für allgemeine Botanik in Hamburg, der mir in seinem Institut freundlich einen Arbeitsplatz zur Verfügung stellte.

#### Literatur

- K a h o, H., 1923: Über die physiologische Wirkung der Neutralsalze etc. Acta et Comm. Univ. Dorpat A V 4.  
— 1933: Das Verhalten der Pflanzenzelle gegen Schwermetallsalze. Planta 18, 1933.  
W a l k e r, J., 1921: Einführung in die Physikalische Chemie.



# Kritische Untersuchungen zur kolorimetrischen Bestimmung der isoelektrischen Punkte einzelner Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe

Von

**Eva Meß**

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin

Mit 4 Textabbildungen

*(Eingegangen am 25. Oktober 1955)*

## I. Einleitung

Für den Ablauf des physiologischen Geschehens in den Zellen ist die Lage der isoelektrischen Punkte (IEP) der einzelnen Zellbestandteile von Bedeutung. Häufig ist daher versucht worden, die IEP-Werte durch Anfärben mit Farbstoffpaaren bzw. mit Acridinorange oder elektrophoretisch an lebenden und toten Zellen zu bestimmen. Bis heute dürfte es wohl kaum möglich sein, den IEP der einzelnen Zellbestandteile einer lebenden Zelle einwandfrei zu erfassen (Drawert 1951 b), so daß man auf tote Zellen angewiesen ist. Man darf die an totem Material gewonnenen Werte aber nicht ohne weiteres auf die lebende Zelle übertragen, da durch den Fixierungsprozeß eine grundlegende Änderung der Ampholyte eintreten dürfte. Es ist naheliegend anzunehmen, daß auch die Art der Fixierung von maßgeblichem Einfluß auf die Lage der IEP sein kann (Stearn u. Stearn 1924 u. f., Zeiger 1930, Yamaha u. Ishii 1933, Yamaha 1936, Drawert 1937 b, Schwantes 1952).

Die meisten Bestimmungen des IEP sind wohl färbetechnisch gewonnen worden. Die Farbstoffbindung tritt in erster Linie auf Grund der Ampholytnatur der das Plasma zusammensetzenden Protein- und Proteidkörper ein. Die Bindung der basischen und sauren Farbstoffe erfolgt vor allem an den Carboxyl- und Aminogruppen und stellt eine Ionenbindung (Salzbildung) dar, die nach stöchiometrischer Gesetzmäßigkeit verläuft (Rawlins u. Schmidt 1929 und 1930, Stearn u. Stearn 1930, Stearn 1931, Singer 1952). Ein Eiweißkörper ist bei einem pH-Wert des umgebenden Mediums unterhalb seines IEP positiv geladen und kann eine Bindung mit den Anionen saurer Farbstoffe eingehen, oberhalb seines IEP verhält er sich

negativ geladen und kann daher die Kationen eines basischen Farbstoffes adsorbieren (Stearn u. Stearn 1923 u. f., Nordmeyer 1948). Über die Farbstoffeigenschaften, die Farbstoff-Eiweiß-Bindungen und die sie bedingenden Kräfte berichten ausführlich Zeiger (1938) und Singer (1952).

Die am fixierten Material färbetechnisch gewonnenen Ergebnisse der einzelnen Autoren weichen aber zum Teil ganz beträchtlich voneinander ab. Dies kann z. T. durch die benutzten Fixierungsmethoden bedingt sein, aber auch auf die angewandten Farbstoffe zurückzuführen sein. Es war deshalb von Interesse, diesen Punkten nachzugehen und zu prüfen, wieweit das färbetechnische Verfahren uns überhaupt brauchbare Ergebnisse liefern kann. Die Versuche wurden an den Oberepidermen der Schuppenblätter von *Allium cepa*, den Blättern von *Helodea densa* und an Gelatine als Modell durchgeführt. Da nach Zeiger (1930) Alkohol ein chemisch relativ indifferentes Fixierungsmittel darstellen soll, wurde vorwiegend mit alkohol-fixiertem Material gearbeitet bzw. diente dieses als Vergleichsstandard.

## II. Die Beeinflussung des IEP von Gelatine durch Oxydations- und Reduktionsmittel, Alter und Konzentration der Farbstofflösungen

### 1. Versuche mit Oxydations- und Reduktionsmitteln

Nach Stearn und Stearn (1924 a, b, 1931) sollen Oxydations- und Reduktionsmittel auf die Lage des IEP einen Einfluß haben. Es wurde deshalb zunächst geprüft, inwieweit diese Mittel auf die Lage des IEP von Gelatine einwirken.

#### a) Methode

Für die Versuche wurde nach Loeb (1924) gereinigte Gelatine verwandt. Das Gelatinepulver wurde entsprechend der Vorschrift mit  $n/128$  Essigsäure ausgewaschen, mit Aqua dest. nachgewaschen, auf dem Wasserbad geschmolzen und auf Glasplatten ausgegossen.

Als Farbpaar diente Säurefuchsin/Methylenblau jeweils im Verhältnis 1:1000 in glasdest. Wasser gelöst. Ich bediente mich des Methylenblaus der Firma P. Altmann, Berlin, Vorkriegsware, und des Säurefuchsin der Firma Merck, Darmstadt. Zur Einstellung des pH-Wertes benutzte ich Phosphatpuffer und HCl (vgl. Strügger 1949 a). Die Gelatinefolie wurde bei acht verschiedenen pH-Werten zwischen pH  $\sim 1,7$  und  $\sim 7,2$  angefärbt. Zur pH-Messung diente eine Glaselektrode.

Die Stückchen der Gelatinefolie (25–35 mg) wog ich mit einer Torsionswaage ein. Sie kamen in 10 cm<sup>3</sup> Farblösung verschiedener Acidität (5 cm<sup>3</sup> Farblösung 1:1000 + 5 cm<sup>3</sup> Puffer). Das Färben (2 Stunden) erfolgte bei  $\sim 15^{\circ}\text{C}$  (Wasserkühlung). Die zum Anfärben benutzte Farbstofflösung hatte also eine Konzentration von 1:2000. Fand eine Vorbehandlung statt, so spülte ich die Gelatine, bevor sie in die gepufferte Farblösung gelangte, mit Aqua dest. oder farblosem Puffer ab. Nach Ablauf der Färbezeit ersetzte ich die Farbstofflösung durch farblosen Puffer. Unter dreimaligem Erneuern des Puffers wurde die Gelatine 2 Stunden lang ausgewaschen. Das Auswaschen erfolgte im Eisschrank bei  $\sim 4^{\circ}\text{C}$ . Danach löste ich die gefärbten Gelatinestückchen jeweils in 15 cm<sup>3</sup> Aqua dest. + 5 cm<sup>3</sup>  $n/10$  HCl. Der Säurezusatz war notwendig, um die Lösungen für die kolorimetrischen Messungen auf den gleichen pH-Wert zu bringen, zumal beim Säurefuchsin im schwach sauren Gebiet ein Farbintensitätsabfall auftritt.

Die derart gewonnene Farblösung photometrierte ich gegen eine Lösung von  $\sim 30$  mg Gelatine +  $15 \text{ cm}^3$  Methylenblau- (bzw. Säurefuchsin-) Lösung der Verdünnung  $1 : 1.000.000 + 5 \text{ cm}^3$   $n/10$  HCl. Ich benutzte das Leitz-Kompensationsphotometer. Den geringsten Filterfehler zeigte für Säurefuchsinlösung das Filter 530 und für die Methylenblaulösung das Filter 570.

Durch Einmessen einer Eichkurve für Säurefuchsin und einer Kurve für Methylenblau (Winkel gegen bekannte Farbstoffkonzentration aufgetragen) war es mir möglich, die Konzentration der einzelnen Gelatine-Farbstoff-Lösungen zu bestimmen. Jeder Winkelwert für die Eichkurven und für die IEP-Kurven ergab sich als Mittelwert aus je 10 Photometerablesungen.

Zur Ermittlung des IEP wurde Milligramm gespeicherten Farbstoffs pro Gramm Gelatine gegen die pH-Werte als Kurve aufgetragen. Die Skala des Säurefuchsin's glich ich jeweils der des Methylenblaus an, indem die Differenz zwischen der maximalen und der minimalen Farbstoffaufnahme des Säurefuchsin's der des Methylenblaus gleichgesetzt wurde. Die Schmiegunskurven zu den streuenden Meßpunkten bestimmte ich durch das Ermitteln der Dreiecksschwerpunkte aus den drei jeweils aufeinanderfolgenden Meßpunkten.

Zu jeder der Vorbehandlungsweisen wurden zumindest drei Parallelversuche durchgeführt.

### b) Ergebnisse

In Tab. 1 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 1. IEP-Bestimmung mit Säurefuchsin/Methylenblau an verschieden vorbehandelter Gelatine.

Vorbehandlungsweise	IEP
unvorbehandelt . . . . .	4,8
$\frac{1}{2}$ Stunde in $n/10$ $\text{SnCl}_2$ , gelöst in $0,2 n$ HCl . . . . .	6,0
$\frac{1}{2}$ Stunde mit $\text{H}_2$ in $n/10$ HCl . . . . .	5,9
$\frac{1}{2}$ Stunde in $n/10$ HCl . . . . .	5,9
$\frac{1}{2}$ Stunde in $n/10$ $\text{HNO}_3$ . . . . .	6,0
$\frac{1}{2}$ Stunde in 3%igem $\text{H}_2\text{O}_2$ . . . . .	4,7

Vergleicht man die Lage der IEP der Gelatine nach den verschiedenen Vorbehandlungsmethoden mit dem IEP, der für unbehandelte Gelatine ermittelt wurde, so ist ganz allgemein eine Verschiebung der IEP ins schwächer saure Gebiet hinein zu verzeichnen. Eine Ausnahme bildet nur die Vorbehandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , nach der der IEP um wenig in das stärker saure Gebiet hinein absank.

### c) Diskussion der Ergebnisse

Nach Stearn und Stearn (1931), die Versuche an Bakterien durchführten, verschieben Oxydationsmittel den IEP in den stärker sauren und Reduktionsmittel in den schwächer sauren Bereich. Mit Hilfe dieser Theorie von Stearn und Stearn könnten wohl meine Ergebnisse mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{SnCl}_2$  und  $\text{H}_2$  erklärt werden, nicht aber das Ergebnis mit  $\text{HNO}_3$ , die, obwohl sie eine oxydierende Substanz ist, die stärkste Verlagerung zum Neutralpunkt hin bewirkte. Weiterhin stimmt die Tatsache bedenklich, daß die Vorbehandlung der Gelatine mit  $n/10$  HCl und mit  $\text{H}_2$  in  $n/10$  HCl prak-

tisch dieselbe Veränderung der Lage des IEP mit sich bringt. Es kann wohl angenommen werden, daß diese Verschiebung nur auf die  $n/10$  HCl zurückzuführen ist.

Bei der Behandlung mit  $H_2$  befand sich die Gelatine  $\frac{1}{4}$  Stunde lang in  $n/10$  HCl, die von einem  $H_2$ -Strom durchperlt wurde, der von einem verkupferten Zinkstückchen ausging. Die Gelatinefolie war nach kurzer Zeit dicht mit  $H_2$ -Bläschen besetzt. Es bleiben nach den Versuchen nur die Schlußfolgerungen offen, daß der Wasserstoff nicht eindringen konnte, vielleicht auch nicht lange genug auf die Gelatine eingewirkt hat, oder daß die Gelatine durch den Wasserstoff nicht angegriffen wird.

Die Änderung der Lage des IEP durch die Behandlung mit in 0,2 mol HCl gelöstem  $SnCl_2$  ist leider auch nicht eindeutig auf eine Reduktion zurückzuführen. So schreiben Sek i (1933) und Tolstoo u h o v (1928), daß Schwermetallsalze die azidophilen Eigenschaften von Eiweiß steigern, weil es durch die Metallionen zu einer Herabsetzung der negativen Ladung des Eiweißes kommt. Dies ist gleichbedeutend mit einer Verlagerung des IEP ins schwächer saure Gebiet hinein. Außerdem bleibt bei meinem Versuch auch hier die Annahme offen, die HCl habe die Verschiebung bewirkt.

Meine Neigung, das Absinken des IEP ins schwächer saure Gebiet hauptsächlich auf die Säureeinwirkung zurückzuführen, begründet sich auf die Ausführungen Fishers (1953), wonach basophile Substanzen durch Mineralsäuren zerstört werden. Das kommt einer Verlagerung des IEP durch Säuren ins schwächer saure Gebiet hinein gleich. Mit dieser Anschauungsweise steht auch das Ergebnis meiner Versuche mit  $HNO_3$  in Einklang.

Den Angaben von Stearn und Stearn (1931 u. a.), nach denen Oxydationsmittel den IEP von Bakterien ins stärker saure Gebiet und Reduktionsmittel den IEP ins schwächer saure Gebiet hinein verschieben, widersprechen aber auch verschiedene Befunde anderer Forscher. So fanden Fischer und Larose (1952) an Wolle und Bakterien, daß gerade alkalische Reagenzien und Reduktionsmittel ein Absinken der Lage des IEP ins stärker saure Gebiet bedingen, d. h. anfänglich Gram-negative Bakterien und Wolle werden durch Behandlung mit Alkalien oder Reduktionsmitteln Gram-positiv und mit Säuren und Oxydationsmitteln lassen sich Gram-positive Bakterien und Wolle in Gram-negative umwandeln. Ähnliche Angaben über die Veränderlichkeit der Lage des IEP finden sich auch bei Sek i (1933).

Nach den Befunden von Sek i (1933), Singer (1952), Fischer und Larose (1952) und Fisher (1953) können die Ergebnisse meiner Versuche mit  $SnCl_2$  in 0,2 mol HCl und  $H_2$  in  $n/10$  HCl so erklärt werden, daß die reduzierende Wirkung des  $SnCl_2$  und des  $H_2$  von der Wirkung der Säure überkompensiert wird. Vielleicht beruht die Wirkung des  $SnCl_2$  auch nicht auf seinen reduzierenden Eigenschaften, sondern es wirkt als Schwermetallverbindung und reagiert mit den COOH-Gruppen des Eiweißes. Eine analoge Erklärung gibt Tolstoo u h o v (1928) für Quecksilberverbindungen. In diesem Falle würde die Wirkung der HCl, in der das  $SnCl_2$  sich gelöst befindet, und das  $SnCl_2$  selbst den IEP in der gleichen Richtung, nämlich zum Neutralpunkt hin, verschieben.

Einer Erklärung bedarf noch das Ergebnis des  $H_2O_2$ -Versuches. Nach der Anschauung von Stearn und Stearn wäre ein Abfallen des IEP der Gelatine ins stärker saure Gebiet durch die Behandlung mit einem Oxydationsmittel zu erwarten. Jedoch ist bei meinen Versuchen das Absinken so minimal, daß es kaum als Bestätigung der Theorie von Stearn und Stearn genommen werden kann. Nach den Befunden von Fisher und den oben angeführten Autoren müßte aber nach der Behandlung mit  $H_2O_2$  eine Verschiebung des IEP ins schwächer saure Gebiet erfolgt sein, was aber in meinen Versuchen auch nicht der Fall ist. Eine Bemerkung aus der Arbeit von Fischer und Larose (1952) kann hierfür eine Erklärung geben. Danach wirkt  $H_2O_2$  nur im alkalischen Milieu oxydierend.  $H_2O_2$  ist von mir bei der Vorbehandlung der Gelatine aber nicht in alkalischem Milieu angewandt worden. Außerdem würde das Wasserstoffperoxyd nach dieser Theorie eine Veränderung der Lage des IEP ins schwächer, die Alkalien ein Absinken ins stärker saure Gebiet hinein bewirken; diese beiden Prozesse würden sich also aufheben oder, besser gesagt, konträr verlaufen.

Der Theorie von Stearn über die IEP-Verschiebung liegt wohl die Vorstellung zugrunde, daß von Oxydationsmitteln die  $NH_2$ -Gruppen und von Reduktionsmitteln die  $COOH$ -Gruppen der Eiweißkörper angegriffen werden. Fischer und Larose sehen aber den Angriffspunkt der Reduktionsmittel in den S-S-Bindungen verschiedener Eiweißarten. Da SH-Gruppen schwach saure Gruppen sind, bedeutet das eine Verschiebung des IEP ins stärker saure Gebiet. Umgekehrt hat eine Herstellung von S-S-Bindungen durch Oxydation eine Verlagerung des IEP ins schwächer saure Gebiet zur Folge. Daß Gelatine Eiweißarten mit S-S-Bindungen besitzt, ist allerdings unwahrscheinlich. Jedoch ist nach Singer (1952) außer den  $NH_2$ -, den  $COOH$ - und den SH-Gruppen noch mit anderen farbstoffbindenden Gruppen des Eiweißes zu rechnen.

Nach meinen Versuchsergebnissen ist also beim Fixieren mit Fixierungsmitteln, die Säuren, Oxydantia oder Schwermetallverbindungen enthalten, eine Veränderung der Lage des IEP der Eiweißbestandteile pflanzlicher Gewebe zur alkalischen Seite hin zu erwarten. Für eine Verlagerung des IEP in das stärker saure Gebiet durch das Einwirken von Reduktionsmitteln konnte ich keinen Nachweis erbringen.

## 2. Der Einfluß des Alters der Farblösungen auf die ermittelten IEP-Werte von Gelatine

Nach Angaben von mehreren Autoren (v. Möllendorff 1918, Gicklhorn 1931, Nistler 1931) ändert sich mit dem Alter in vielen Farbstofflösungen die Teilchengröße und damit auch die Diffusibilität. Im Verein damit müssen sich aber auch die Adsorptionsbedingungen des Farbstoffes am Eiweiß ändern. Es erschien mir deshalb die Frage wichtig, ob und in welcher Weise vielleicht auftretende Alterungserscheinungen von Säurefuchsin und Methylenblau den ermittelten IEP von Gelatine zu beeinflussen vermögen.

Der Ansatz der Versuche entsprach vollkommen demjenigen unter Ab-

schnitt 1 besprochenen, nur mit dem Unterschied, daß die Gelatine keiner Vorbehandlung unterworfen war und daß das Alter der Farblösungen variierte.

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist der Tab. 2 zu entnehmen. Es ist ersichtlich, daß die ermittelten IEP-Werte für Gelatine mit zunehmendem Alter der Farbstofflösung in das stärker saure Gebiet hinein absinken.

Tab. 2. *Bestimmung des IEP von Gelatine mit Säurefuchsin- und Methylenblau-Lösungen verschiedenen Alters.*

Alter der Farblösungen	IEP-Werte
2 Stunden . . . . .	pH 4,9
18—22 Stunden . . . . .	4,7
1 Monat . . . . .	4,4
1½ Monate . . . . .	4,3

### 3. Der Einfluß der Konzentration der Farbstofflösungen auf die ermittelten IEP-Werte von Gelatine

Die Anfärbung der Gelatine wurde unter den gleichen Bedingungen wie im Abschnitt 2, nur mit unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen vorgenommen. Als Farbstoffpaar diente wiederum Säurefuchsin und Methylenblau. Die Farbstoffkonzentrationen betrugen 1:1000, 1:2000 und 1:4000 in Phosphatpuffer gelöst.

Für die Konzentration 1:1000 ermittelte ich den IEP-Wert bei pH 4,8, für 1:2000 bei pH 4,7 und für 1:4000 bei pH 4,3. Auch hier liegen jedem dieser Werte drei Parallelversuche zugrunde. Es ist also mit abnehmender Konzentration ein Absinken der mit Säurefuchsin/Methylenblau bestimmten IEP-Werte festzustellen. Die Kurven in Abb. 1 lassen erkennen, wie sowohl für das Säurefuchsin als auch für das Methylenblau die Adsorptionsquote an der Gelatinefolie mit zunehmender Farbstoffkonzentration steigt.

Levine (1940), der seine Studien an Ciliaten und mit den Farbstoffen Methylenblau, Toluidinblau 0, Nilblausulfat, Kristallviolett, Ponceau 2 R und Orange G durchführte, kommt zu analogen Ergebnissen. Levine sagt, daß die Kurve um so weiter auf der sauren Seite verläuft, je höher die Konzentration des basischen Farbstoffes ist, und um so mehr zum Neutralpunkt hin verschoben ist, je höher die Konzentration des sauren Farbstoffes liegt. Damit verbunden sei im ersten Fall eine Verschiebung des IEP in den stärker sauren Bereich hinein, im zweiten Fall eine Verlagerung des ermittelten IEP-Wertes zum Neutralpunkt hin. Dies trifft aber allein dann zu, wenn nur die Konzentration des einen Farbstoffpartners verändert und die des anderen beibehalten wird. Verändert man die Konzentration beider Farbstoffe des Farbstoffpaares, so muß der erhaltene IEP-Wert aus der Verschiebung beider Kurvenzüge resultieren. Im Falle des Säurefuchsin und des Methylenblaus ergibt sich, wie aus meinen Versuchen hervorgeht, mit abnehmender Konzentration beider Farbstoffe eine Verschiebung der IEP-Werte in den Bereich höherer pH.

Nach v. Möllendorff (1918), Gicklhorn (1931) und Nistler



(1931) wird mit zunehmender Konzentration in vielen Farbstofflösungen der Dispersitätsgrad geringer, d. h. die Teilchen werden größer und dementsprechend der Diffusionskoeffizient kleiner. Dies trifft auch für Säurefuchsin und Methylblau zu (vgl. Nistler 1931).

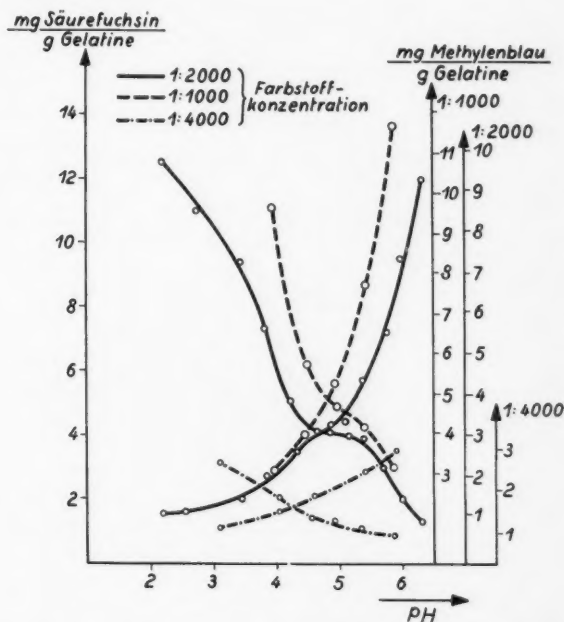


Abb. 1. Färbung von Gelatinefolie mit Säurefuchsin/Methylblau-Lösungen unterschiedlicher Konzentration. Mittelwerte aus drei Parallelversuchen.

Die Kurvenzüge, die sich aus der Färbung von Gelatine mit unterschiedlich alten Farblösungen ergeben, sind gegeneinander nicht so gleichsinnig verschoben wie die Kurven der Abb. 2. Wohl verschieben sich hier wie dort, also mit zunehmendem Alter und mit abnehmender Konzentration, die ermittelten IEP-Werte ins stärker saure Gebiet hinein. Es geht aber aus dem Vergleich der unter Abschnitt 2 und 3 beschriebenen Versuche und den aus ihnen resultierenden Kurven nicht hervor, daß es sich auch bei den gealterten Farbstoffen um eine Konzentrationsabnahme handelt. Die Annahme einer chemischen Veränderung des Methylblaus während des Alterns ist nicht auszuschließen. Holmes und Snyder (1929) beobachteten beim Altern des Methylblaus eine Oxydation oder Dealkylierung des Farbstoffes in alkalischen Lösungen. Der Farbstoff zerfällt dabei in niedere Homologe (vgl. auch Brooks und Moldenhauer-Brooks 1941). Wieweit sich dieser Befund von Holmes und Snyder auf meine in glasdest. Wasser angesetzten Methylblaulösungen übertragen läßt, bleibt allerdings fraglich. Es müssen wohl für die veränderten Färbeverhältnisse mit gealterten Farbstoffen in erster Linie veränderte Bedingungen für den Donnan-Membraneffekt in Abhängigkeit von der Dispersitätsänderung der Farbstoffe verantwortlich gemacht werden.

### III. Die Bestimmung des IEP mit verschiedenen Farbstoffpaaren

Nach der Feststellung einer Abhängigkeit der IEP-Bestimmung vom Alter und von der Konzentration der benutzten Farbstofflösungen war es ferner von Interesse zu untersuchen, wieweit die Werte für den IEP bei der Anwendung verschiedener Farbstoffpaare variieren. Zur Prüfung dieser

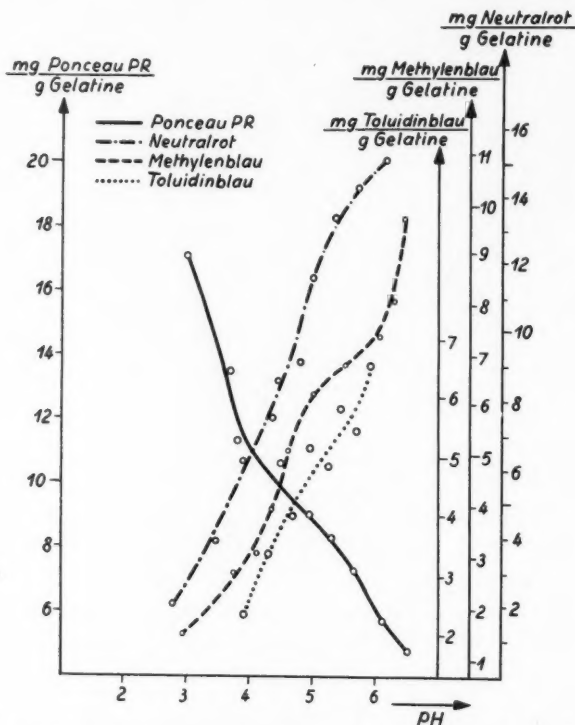


Abb. 2. Färbung von Gelatinefolie mit verschiedenen basischen Farbstoffen und zur Bestimmung des IEP zu Ponceau PR als saurem Farbstoff in Beziehung gesetzt.

Frage wurden Versuche mit Gelatine und mit fixiertem Pflanzenmaterial durchgeführt.

Dazu wurden ausdifferenzierte Blättchen von *Helodea densa* genommen, die bereits 6 Monate in 70%igem unvergälltem Alkohol lagen. Die in Tab. 5 gemachten Angaben beziehen sich auf die Zellen der Blattmitte, die auch nicht der Randzone oder der Mittelrippe angehörten. Die Zellen der Blattbasis, der Blattspitze, der Randzone und der Mittelrippe verhalten sich bei der Färbung bekanntlich anders (Drawert 1938, Reuter 1955). Außerdem kamen nur die Zellen der Blattunterseite zur Beobachtung. Ferner wurde die Oberepidermis der Schuppenblätter von *Allium cepa* nach den Angaben von Strugger (1949 a) präpariert und mehrere Stunden bis Tage in 70%igem reinem Alkohol fixiert. Es fand nur die Epider-

mis des mittleren Teils der zweiten Schuppe von außen nicht ausgetriebener Zwiebeln Verwendung.

Folgende Farbstoffe wurden untersucht:

basische: Methylenblau (P. Altmann, Berlin), Toluidinblau (stand. Bayer, Leverkusen), Neutralrot (Merck, Darmstadt), Safranin (stand. Hollborn u. Söhne, Leipzig);

säure: Säurefuchsin (Merck, Darmstadt), Bordeaux R, Ponceau PR, Erythrosin pur., Eosin rot (alle vier von Grübler u. Co., Leipzig), Wasserblau (P. Altmann, Berlin).

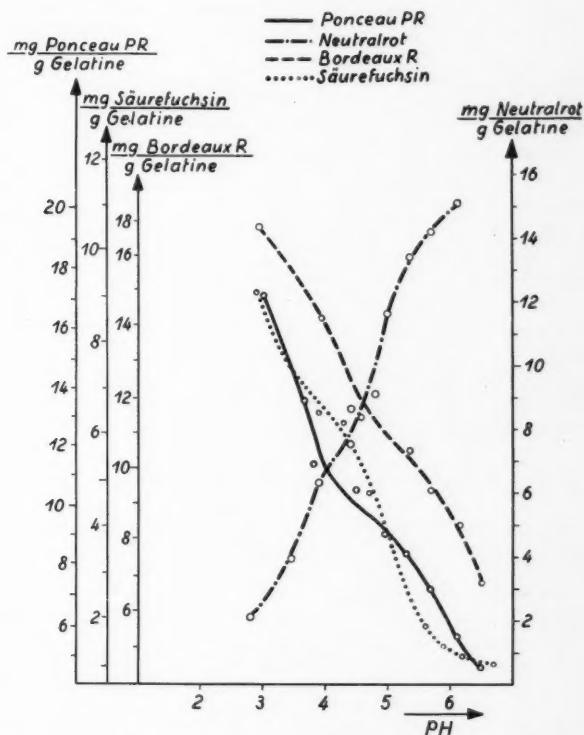


Abb. 3. Färbung von Gelatinefolie mit verschiedenen sauren Farbstoffen und zur Bestimmung des IEP zu Neutralrot als basischem Farbstoff in Beziehung gesetzt.

### 1. Versuche mit Gelatine

Wie aus Tab. 3 hervorgeht, schwankt der ermittelte IEP-Wert zwischen pH 4,0 und 5,5. Die Abb. 2 und 3 vermitteln einen Eindruck davon, wie die erhaltenen Werte für den IEP bei gleichbleibendem sauren bzw. basischen Farbstoff in Abhängigkeit vom jeweiligen basischen oder sauren Farbstoff variieren können.

## 2. Versuche mit Pflanzenmaterial

An den Epidermen von *Allium* und den Blättchen von *Helodea* traten folgende Färbungsbilder auf.

**Methylenblau.** *Allium*: Die Kerne, das Cytoplasma und die Wände färbten sich rein blau. Ab pH 4,5 war auch das Cytoplasma recht intensiv gefärbt.

Tab. 3. IEP-Bestimmungen an Gelatine mit verschiedenen Farbstoffpaaren.

Farbstoffpaar	IEP-Werte
Säurefuchsin/Methylenblau . . . . .	pH 4,7
Säurefuchsin/Toluidinblau . . . . .	4,4
Säurefuchsin/Neutralrot . . . . .	4,4
Bordeaux R/Neutralrot . . . . .	4,6
Ponceau PR/Neutralrot . . . . .	4,0
Ponceau PR/Toluidinblau . . . . .	4,7
Ponceau PR/Methylenblau . . . . .	4,5
Erythrosin/Safranin . . . . .	5,4
Eosin/Safranin . . . . .	5,5
Wasserblau/Toluidinblau . . . . .	4,2
Wasserblau/Methylenblau . . . . .	5,0

Die Kerne und die Wände färbten sich schon bei höherer cH an. *Helodea* verhielt sich ähnlich.

**Toluidinblau.** Es trat mit fallender cH eine immer stärker werdende Violettfärbung der Wände auf, die auch diffus in das Zellumen strahlte. Sie behinderte an beiden Objekten die Beobachtung der übrigen Zellelemente.

Tab. 4. IEP-Bestimmungen an den Oberepidermiszellen von *Allium cepa* mit verschiedenen Farbstoffpaaren.

Farbstoffpaar	IEP-Werte		
	Wand	Cytoplasma	Kern
Säurefuchsin/Methylenblau . . .	pH 3,0-3,2	pH 4,2	pH 3,9
Säurefuchsin/Toluidinblau . . .	2,2-2,6	4,7	3,9
Säurefuchsin/Neutralrot . . . .	2,2-2,6	4,6	4,1
Bordeaux R/Neutralrot . . . .	2,2-2,6	4,3	3,7
Ponceau PR/Neutralrot . . . .	2,2-2,6	4,5	3,7
Ponceau PR/Toluidinblau . . .	2,2-2,6	4,6	4,0
Ponceau PR/Methylenblau . . .	3,1	4,3	4,1
Erythrosin/Safranin . . . . .	3,1	5,1	4,6
Eosin / Safranin . . . . .	3,1	4,9	4,5
Wasserblau/Toluidinblau . . .	2,2-2,6	5,2	4,6
Wasserblau/Methylenblau . . .	3,0-3,2	4,5	4,3

**Neutralrot.** Das Plasma von *Allium* wurde erst in schwach saurem Milieu gut angefärbt.

**Safranin,** stand. Die Färbung der Zellelemente nahm mit fallender cH nur langsam zu. Die IEP-Bestimmung wurde dadurch erschwert.

**Säurefuchsin.** Die Färbung war gut zur IEP-Bestimmung geeignet. Sie fiel mit fallender cH relativ schnell ab. Über pH 5 war kaum noch eine Färbung zu beobachten.

Tab. 5. IEP-Bestimmungen an Blättern von *Helodea densa* (Unterseite) mit verschiedenen Farbstoffpaaren.

Farbstoffpaar	IEP-Werte			
	Wände	Plastiden	Kerne	Kerne-Plastiden
Säurefuchsin/Methylenblau . . .	pH 2,6-2,8	pH 4,5	pH 4,2	—
Säurefuchsin/Toluidinblau . . .	2,2-2,6	4,6	4,3	—
Säurefuchsin/Neutralrot . . . .	1,7-2,2	4,5	4,3	—
Bordeaux R/Neutralrot . . . .	1,7-2,2	—	—	4,3
Ponceau PR/Neutralrot . . . .	1,6-2,2	—	—	4,0
Ponceau PR/Toluidinblau . . .	1,6-2,2	—	—	4,3
Ponceau PR/Methylenblau . . .	2,6-2,8	—	—	4,1
Erythrosin/Safranin . . . . .	2,3-2,7	—	—	4,5
Eosin/Safranin . . . . .	2,3-2,7	4,3	4,2	—
Wasserblau/Toluidinblau . . .	2,2-2,6	—	—	4,4
Wasserblau/Methylenblau . . .	2,2-2,8	—	—	4,1

**Bordeaux R.** Die Kernfärbung nahm bei *Allium* von pH 4,1 bis 6 kaum noch ab.

**Ponceau PR.** Die Färbung verlief der mit Säurefuchsin entsprechend.

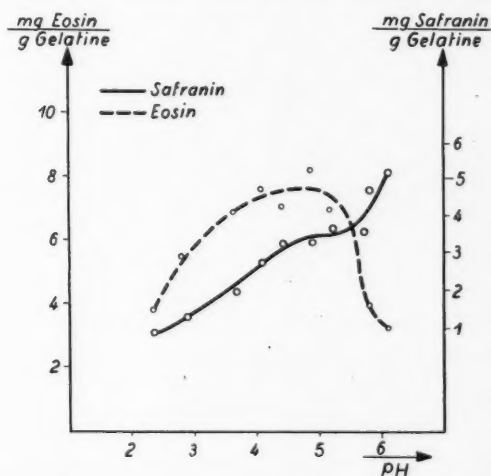


Abb. 4. Bestimmung des IEP von Gelatine mit Hilfe des Farbstoffpaares Eosin/Safranin. Die maximale Aufnahme von Eosin erfolgt erst zwischen pH 4 und 5.

**Erythrosin pur.** Der Farbstoff fiel in den Puffern mit pH 1,5 und 3,2 aus. Es erfolgte daher keine Anfärbung der Gewebe. Die Färbung nahm dann mit fallender cH nur sehr langsam ab. Die IEP-Bestimmung machte daher Schwierig-

keiten. Wie die Färberversuche an Gelatinefolie zeigen, wurde die maximale Farbstoffmenge zwischen pH 4 und 5 aufgenommen (vgl. Abb. 4).

Eosin rot. Es gilt das bei Erythrosin Gesagte.

Wasserblau. *Allium*: Die Färbung nahm von pH 4,5 bis 5,6 kaum an Intensität ab. Sie ging nur mit fallender cH in ein violettes Blau über. Zur IEP-Bestimmung dürfte Wasserblau kaum geeignet sein. Für *Helodea* war dieser Farbstoff ab pH 3,8 nicht mehr zu gebrauchen, da er nur noch eine geringe fleckige Färbung verursachte. Selbst innerhalb einer einzelnen Zelle war die Färbung der Chloroplasten ganz unterschiedlich. Ausgezeichnet färbten sich dagegen bis pH 5,6 die Kerne und das Cytoplasma von Diatomeen und anderen niederen Algen, die den Blättern von *Helodea* aufsäßen.

Die Tab. 4 und 5 vermitteln eine Übersicht über die unterschiedliche Lage der IEP bei Färbung mit verschiedenen Farbstoffpaaren. Jedem der Tabellenwerte liegen drei Parallelversuche zugrunde.

Bei *Allium* beruhen die Angaben über den IEP der Wände auf dem Eintreten der Färbbarkeit mit basischen Farbstoffen. Eine Wandfärbung mit sauren Farbstoffen konnte hier nicht erzielt werden. Die Zellwände von *Helodea densa* färbten sich dagegen mit sauren Farbstoffen recht gut an.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß bei beiden Versuchsobjekten die Farbpaaire Wasserblau/Toluidinblau und Erythrosin/Safranin die dem Neutralpunkt am nächsten gelegenen Werte für die IEP lieferten.

### 3. Diskussion der Ergebnisse

Das Verhalten des Farbstoffes Wasserblau scheint mir bemerkenswert zu sein. *Helodea densa* färbt sich nur schwach und ungleichmäßig mit Wasserblau an. Ab pH 4,4 sind die Zellbestandteile kaum noch gefärbt. Die Färbung ist meist bei pH 3,8 schon recht schwach. Der Farbstoff läßt sich aus den Blättchen auch sehr leicht wieder auswaschen. Dagegen färben sich Algen, die den *Helodea*-Blättchen aufsitzen und die Zwiebelepidermis mit ihren Zellbestandteilen ausgezeichnet (Zellwand ausgenommen). Die Färbung ist aber auch an diesen Objekten zur IEP-Bestimmung nicht als günstig zu bezeichnen, da sie mit fallender cH nur sehr langsam abnimmt, namentlich in den Kernen. Die Nucleolen der *Allium*-Kerne sind auffallend intensiv blau gefärbt.

Nach D r a w e r t (1951 a) wird Opalblau und Wasserblau im S c h u l t z (1951) unter derselben Nummer geführt, und im Vitalfärbungsversuch stimmen beide in ihrer Unaufnehmbarkeit überein. Beide Farbstoffe sollen auch in ihrem physiko-chemischen Verhalten identisch sein. Es besteht also wohl die Berechtigung, Versuchsergebnisse der Wasserblaufärbung mit denen der Opalblaufärbung zu vergleichen. Nach der zitierten Arbeit von D r a w e r t ist Opalblau zwischen pH 3,2 und 10,3 weitgehend dissoziiert. Es wäre also bei Wasserblau zumindest eine ähnliche Affinität zu den Cytoplasma- und Kern-Eiweiß-Verbindungen zu erwarten wie bei anderen sauren, gut dissoziierten Farbstoffen (z. B. Säurefuchsin und Ponceau). Für die Epidermiszellen von *Allium* trifft dies auch zu. Es bleibt die Frage, warum dies bei den Blattzellen von *Helodea densa* nicht der Fall ist.



Nach Nistler (1931) und v. Möllendorff (1918) besitzen die Farbstoffteilchen von Wasserblau in wässriger Lösung durchschnittlich einen relativ großen Radius, der sich selbst bei abnehmender Farbstoffkonzentration nicht verringert. Der Radius ( $11,8 \times 10^{-8}$  cm, Nistler 1930 nach Gicklhorn 1931) der Wasserblaueteilchen liegt mit seiner Größe weit über den Teilchenradien der anderen von mir benutzten sauren Farbstoffe (vgl. auch Fautrez u. Lison 1937). Es liegt der Schluß nahe, daß die Wände der Blattzellen von *Helodea densa* für Wasserblau, auf Grund seiner hohen Teilchengröße, kaum permeabel sind, wohl aber die Wände der Epidermiszellen von *Allium* und die der den *Helodea*-Blättern aufsitzenden Algen.

Von besonderem Interesse ist die Tatsache, daß die Wände von *Helodea densa* sich mit sauren Farbstoffen anfärben lassen, während eine Färbung der Wände der Epidermis von *Allium* damit nicht möglich ist. Offensichtlich müssen die Wände der Zwiebelepidermis und die der Zellen von *Helodea* eine verschiedene chemische Zusammensetzung oder eine andere Struktur aufweisen.

Auf Grund der oben mit Wasserblau gewonnenen Erkenntnisse erscheint mir die Annahme berechtigt, daß es sich bei der Wandfärbung von *Helodea densa* mit sauren Farbstoffen vielleicht um eine Echtfärbung handelt, die, bedingt durch die geringe Wegsamkeit dieser Membranen, durch farblose Puffer nur sehr langsam auswaschbar ist (vgl. hierzu Drawert 1956). In den Wänden der *Allium*-Epidermis, die offenbar großporiger sind, ist der Auswaschprozeß dagegen schnell beendet.

Die IEP-Werte, die ich bei meinen Färbungsversuchen für das Cytoplasma der Zwiebelepidermis und für die Plastiden von *Helodea densa* ermitteln konnte, stimmen im großen und ganzen mit den Werten überein, die Drawert (1937) angibt. Da Drawert aber mit *Helodea canadensis* arbeitete, sind die IEP-Werte für die Plastiden mit meinen nur bedingt vergleichbar.

Meine Angaben über die Lage des IEP der Kerne beziehen sich auf den Ruhekern unter Ausnahme der Nucleoli. Eine getrennte IEP-Bestimmung für das Karyotingerüst und die Karyolymphe war mir an diesen Ruhekernen nicht möglich.

Wie sich aus den beigegebenen IEP-Tabellen ergibt, schwanken die IEP-Werte in Abhängigkeit von den benutzten Farbstoffen bei *Helodea densa* für Kerne und Plastiden im Höchstfalle um 0,5 pH-Einheiten, bei *Allium cepa* für das Cytoplasma um eine pH-Einheit und für die Kerne um 0,9 pH-Einheiten und bei der Gelatinefolie um 1,5 pH-Einheiten.

In Fällen, in denen bei *Helodea densa* der IEP des Kernes vom IEP der Plastiden gesondert bestimmt werden konnte, erwies sich eindeutig, daß der IEP des Cytoplasmas im schwächer sauren Bereich liegt als der des Kernes. Diese Beobachtung wurde bereits von verschiedenen Forschern an unterschiedlichem Material gemacht, so von Yamaha und Ishii (1933) an Wurzelspitzen von *Vicia Faba*, von Drawert (1937) für die Oberepidermis von Zwiebelschuppen und Blättern von *Helodea canadensis* und von

Levine (1940) für *Trichonympha collaris*. Nur Schwantes (1952), der an alkoholfixiertem Material von *Phycomyces Blakesleeanus* mit Acridinorange die IEP-Werte für das Cytoplasma und die Kerne bestimmte, kommt zu einem entgegengesetzten Ergebnis.

Im Vergleich zu den oben angegebenen Differenzen zwischen der Lage des IEP je nach dem benutzten Farbstoffpaar seien hier die Ergebnisse ähnlicher Versuche zweier Autoren angegeben. Levine (1940) bestimmte an *Trichonympha collaris* die IEP der Zellbestandteile mit verschiedenen Farbstoffpaaren. Die Lage des IEP variierte dabei über zwei pH-Einheiten. Wie unterschiedlich die Affinität der einzelnen Farbstoffe zu Fibrin ist, geht aus der Zusammenstellung von Singer (1952) hervor. Durch diese unterschiedliche Affinität muß die Lage des IEP für ein und denselben Zellbestandteil je nach verwendetem Farbstoff und nach der Eiweißzusammensetzung des Gewebes schwanken. Aus der unterschiedlichen Affinität ein und desselben Farbstoffes zu verschiedenen Eiweißarten, Lipoiden usw. läßt sich wohl auch erklären, daß die Veränderungen in der Lage des IEP der Kerne und des Cytoplasmas von *Allium* bzw. der Plastiden und der Kerne von *Helodea densa* und von Gelatine nicht parallel laufen.

Auf Grund der mitgeteilten Versuchsergebnisse ist festzustellen, daß der IEP von Gewebeelementen mit Hilfe von Farbstoffpaaren nicht exakt bestimmbar ist. Näherungswerte vermag diese Methode aber bei der Verwendung geeigneter Farbstoffpaare, z. B. von Säurefuchsin und Methylenblau, zu liefern. Da sie für Gewebe als Untersuchungsobjekt bis jetzt durch keine bessere, eindeutige Bestimmungweise ersetzt werden kann, ist die IEP-Ermittlung durch Färben mit Farbstoffpaaren nicht ohne weiteres abzulehnen. Bei der Mitteilung der mit der Färbemethode erhaltenen Werte müssen aber genaue Angaben über Art und Herkunft der benutzten Farbstoffe, der Farbstoffkonzentration, des Alters der Farblösungen, der Färbetemperatur, der Färbezeit und der Pufferungsart gefordert werden. Nur unter diesen Bedingungen wird man zu vergleichbaren Werten kommen.

#### IV. Über den Längsgradienten in den Schuppenblättern von *Allium cepa*

In den Versuchen zur IEP-Bestimmung der Zellbestandteile der Oberepidermis von *Allium cepa* fiel es auf, daß die Zellen der Spitzenzone, der Mitte und der Basis der Zwiebelschuppe sich in bezug auf die Färbbarkeit in Abhängigkeit von der pH nicht ganz gleichartig verhielten. Da auch von anderen Autoren in verschiedener Beziehung ein unterschiedliches Verhalten der Zonen festgestellt worden ist (Borriß 1937, Zeller 1939, Houska 1939, 1942), wurde mit dem Farbstoffpaar Säurefuchsin/Methylenblau der IEP der Zellbestandteile in den einzelnen Teilen der Oberepidermis bestimmt. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe von selbst hergestellten Farbskalen nach Levine (1940).

Aus Tab. 6 ist ersichtlich, daß die Lage des IEP der Zellbestandteile der Epidermis zwischen Spitze, Mitte und Basis der Blattschuppe differiert, jedoch nur geringfügig. Immerhin ist festzustellen, daß der IEP des Cytoplasmas von der Basis zur Spitze etwas ansteigt. Dagegen zeigen die Kerne und ihre Nucleoli in dem mittleren Teil der Epidermis den niedrigsten IEP-Wert.

Nach Strugger (1933), Drawert (1937) und Floethmann (1954) wird der IEP der Zellbestandteile verschiedener Gewebe mit zunehmendem Alter gegen den Neutralpunkt hin verschoben. Damit in Übereinstimmung befinden sich die IEP-Werte, die ich für das Cytoplasma der Oberepidermis erhielt, da die Zellen der Basis die jüngsten Zellen der Zwiebelschuppen sind.

Tab. 6. IEP-Bestimmungen in den einzelnen Zonen der Oberepidermis der Schuppenblätter von *Allium cepa* mit Säurefuchsin/Methylenblau zur Feststellung eines Längsgradienten.

Zellbestandteile	IEP-Werte		
	Spitze	Mitte	Basis
Kerne . . . . .	pH 3,7	pH 3,5	pH 3,8
Nucleoli . . . . .	3,9	3,8	3,9
Cytoplasma . . . . .	4,2	4,1	4,0

Drawert (1937) und Schwantes (1952) beschreiben allerdings, daß auch der gegenteilige Effekt, eine Verlagerung des IEP der Zellbestandteile mit zunehmendem Alter zur stärker sauren Seite hin, auftreten kann.

Einen derartig gleichsinnigen Anstieg der IEP-Werte von der Basis zur Spitze konnte ich an den Kernen und Nucleoli nicht beobachten. Auffälligerweise liegen die IEP-Werte der Kerne und Nucleoli im mittleren Teil der Epidermis niedriger als in der Basis und in der Spitze.

## V. Färbungsversuche mit Acridinorange an verschieden fixierten Zwiebelepidermen

Im Vergleich zu den mit verschiedenen Farbstoffpaaren erhaltenen Werten erschien es wünschenswert, den IEP dieser Zellbestandteile auch mit der Acridinorange-Methode nach Strugger (1940) und Bukatsch und Haitinger (1940) zu bestimmen.

### 1. Methode und Material

Da sich die Oberepidermis der Zwiebel als geeigneteres Material als die *Helodea*-Blätter erwiesen hatte, benutzte ich nur dieses Objekt für die AO-Färbungen. Das Fixieren der Epidermen erfolgte mit 70%igem Alkohol, 5%iger HCl oder durch Hitze- bzw. Kälteeinwirkung.

Außer Alkohol auch andere Fixierungsmittel zu verwenden, bewog mich vor allem ein Vergleich der Tabellen für hitze- und säuregetötetes Material bei Strugger (1949 b), wonach es offensichtlich durch die Fixierungsart zu einem anderen Färbbild kommt.

Neben Zwiebelepidermen benutzte ich ferner Zellstoffwatte, Gelatine und Toluol, die auch Strugger (1949 b) als Modellsubstanzen dienten, als Färbobjekte.

Das von mir verwandte AO stammte von der Firma Merck, Darmstadt. Der Farbstoff wurde nicht gereinigt. Die AO-Lösung setzte ich in glasdest. Wasser 1:5000 an und verdünnte zur Hälfte mit Phosphatpuffer. So enthielten die gepufferten Farblösungen das AO in der Konzentration 1:10.000. Die Pufferlösungen zum Auswaschen des Farbstoffes nach dem Anfärben versetzte ich zur Hälfte mit glasdest. Wasser, so daß sie die Puffersalze in derselben Konzentration enthielten wie die Farblösungen.

Als Lichtquellen für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit AO dienten entweder eine Kohlenbogenlampe oder eine Quecksilberhöchstdrucklampe. Die verwendeten Filter waren Blaufilter BG 12, 4 mm + gelbes Sperrfilter OG 1 bzw. OG 5 für Blaulichtuntersuchungen oder UV-Filter (UG 1, 2 mm bzw. UG 1, 1,5 mm) + Euphos-Sperrfilter (UV 1,2 bzw. UV 2,5) für Beobachtungen im UV-Licht.

Im voraus sei bemerkt, daß ich zunächst die Eigenfluoreszenz von alkoholfixierten und HCl-fixierten Epidermen in Phosphatpuffer von pH 1,7 bis pH 10,6 prüfte. Die Wände zeigten in diesem pH-Bereich gelbliche Fluoreszenz. Die Kerne fluoreszierten bei pH 1,7 schwach grün. Ab pH 2,6 wiesen dann Kerne und Cytoplasma eine gelbgrüne Fluoreszenz auf. Ab pH 10,6 war die Fluoreszenz so schwach, daß die Epidermisstückchen kaum noch sichtbar waren. Ein Unterschied zwischen dem alkoholfixierten und dem HCl-getöteten Material war nicht zu bemerken. Die Eigenfluoreszenz der Zwiebelepidermen beobachtete ich im Blaulicht und vergleichsweise auch im UV. Über die Eigenfluoreszenz der Bestandteile der Zellen lebender und toter Zwiebelepidermen berichtete bereits ausführlich Drawert (1952). Meine Beobachtungen decken sich mit den Angaben von Drawert für alkoholfixierte Epidermen und abgestorbene Zellen.

## 2. Versuchsergebnisse

### a) Alkoholfixiertes Material

Die Zwiebelepidermen wurden verschieden lange in 70%igem Alkohol fixiert (1½ Stunden bis 21 Tage). Ein merklicher Unterschied in der Färbbarkeit mit AO

Tab. 7. AO-Färbung an alkoholfixierten Zwiebelepidermen mit einer 1 Jahr alten AO-Lösung und variiert Färbezeit. Beobachtungen im Blaulicht.

pH	Wand			Kerne			Cytoplasma		
	¼ Std.	2 Std.	16 Std.	¼ Std.	2 Std.	16 Std.	¼ Std.	2 Std.	16 Std.
1,7	schwach gelbl.	gelbl.	schwach orange	schwach gelbl.	gelb	?	schwach gelbl.	gelbl.	schwach orange
2,8	"	"	"	"	"	gelb	—	dunkel-gelb	"
3,3	gelb-orange	"	kräftig orange	gelb	dunkel-gelb	dunkel-gelb	schwach gelbl.	"	orange
3,8	"	kupfer-rot	kupfer-rot	"	orange	orange	"	orange	kupfer-rot
4,5	orange	"	"	dunkel-gelb	kupfer-rot	kupfer-rot	orange	kupfer-rot	"
5,3	kupfer-rot	kupfer-rot	kupfer	gelb-grün	"	"	orange-rot	"	"
6,0	"	"	"	"	"	"	kupfer-rot	"	"
6,5	"	"	"	grün	"	"	"	"	"
8,2	"	"	"	"	grünl.-rot	grünl.-rot	"	"	"
9,6	—	"	"	—	"	"	—	"	"
10,6	—	negativ	negativ	—	gelb-grün	"	—	gelb-grün	?

ergab sich daraus nicht. Es ist wohl anzunehmen, daß die eine Zellschicht starken Epidermen bereits nach  $1\frac{1}{2}$  Stunden durchfixiert sind und eine Veränderung durch längeres Verbleiben in der Fixierungsflüssigkeit nicht stattfindet. Zu erwarten wäre, daß bei längerem Fixieren in Alkohol ein Teil der Lipide herausgelöst wird. Diese Verminderung der Lipide im Material könnte sich ohnehin nur im alkalischen Milieu auf die AO-Färbung auswirken, wenn der Farbstoff bereits zum größten Teil als undissoziierte Base vorliegt. Ich konnte aber keine prinzipiellen Unterschiede zwischen kurz und lang fixiertem Material feststellen.

Tab. 8. AO-Färbung an alkoholfixierten Zwiebelepidermen mit einer 7 Stunden alten AO-Lösung und variierter Färbezeit. Beobachtungen im Blaulicht.

pH	Wand			Kerne			Cytoplasma		
	$\frac{1}{4}$ Std.	1 Std.	18 Std.	$\frac{1}{4}$ Std.	1 Std.	18 Std.	$\frac{1}{4}$ Std.	1 Std.	18 Std.
1,7	schwach gelbl.	orange	schwach gelb	hell-gelb	gelb	schwach gelb	gelbl.	orange	?
2,8	orange	kupferrot	kupferrot	gelb	„	dunkel-gelb	orange	„	kupferrot
3,3	kupferrot	„	„	„	dunkel-gelb	„	„	orange-rot	„
3,9	„	„	„	„	„	orange	kupferrot	kupferrot	„
4,6	„	„	„	dunkel-gelb	„	„	„	„	„
5,3	„	„	„	„	„	„	„	„	„
5,9	„	„	„	„	„	„	„	„	„
6,5	„	„	„	„	gelb-orange	fahl kupferrot	„	„	„
8,2	„	„	„	„	„	„	„	„	„
9,6	„	„	„	„	gelb	fahl dkl.-rot	„	„	„
10,7	schwach kupferrot	—	„	gelb	„	„	„	?	„

Boerner-Patzelt (1950) äußert Bedenken gegen die Fixierung mit 70%igem Alkohol, da das Material durch 70%igen Alkohol nicht vollständig dehydratisiert wird. Infolgedessen fluoreszieren nur die Kerne der Wundrandzone rot, die bereits durch den Absterbevorgang noch vor der Alkoholfixierung weitgehend dehydratisiert werden; die Kerne des Mittelfeldes, die noch stärker hydratisiert sind, d. h. die AO-Ionen also in relativ geringerer Konzentration enthalten, werden dagegen nur grün fluorochromiert.

Wie die Tab. 7 und 8 belegen, erhielt ich nur bei relativ kurzer Färbezeit mit alter AO-Lösung in schwach saurem Gebiet gelbgrün und im schwach alkalischen oder neutralen Milieu grün fluoreszierende Kerne. Ich nehme aber an, daß in diesem Fall bei pH 5,3, 6,0 und 6,5 Diffusionsschwierigkeiten für den Farbstoff vorliegen, denn bereits nach zweistündiger Färbezeit wiesen die Kerne in diesen pH-Stufen Rotfluoreszenz auf. Die Grünfluoreszenz

bei pH 8,2 ist dagegen wohl auf verminderte Dissoziation des Farbstoffes zurückzuführen.

Ein Unterschied in der Kernfärbung zwischen Wundrandzellen und den Zellen des Mittelfeldes trat auch bei mir auf, aber nicht in der Weise, wie Boerner-Patzelt (1950) und auch Höfler und Mitarbeiter (1950) beschreiben. Nach diesen Autoren fluoreszieren die Kerne des Wundrandes rot und die Kerne des Mittelfeldes grün. Nach meinen Beobachtungen färbten sich die am Schnitttrand gelegenen Kerne nur eine Farbnuance dunkler als die Kerne des Mittelfeldes. Die Tab. 7 und 8 geben im übrigen nur die Farbwerte für das Mittelfeld jedes Epidermisstückchens an. Auf das „Schnitttrandphänomen“ soll später noch näher eingegangen werden (S. 212).

Die Färbungen der Membranen und des Cytoplasmas ( $\frac{1}{4}$  Std.) stimmen dagegen mit den Angaben Höflers gut überein. Auch die von Höfler (1950) beobachteten gelbgrünen Plasmaklumpchen im sonst roten Plasma im neutralen und alkalischen Gebiet konnte ich mehrmals beobachten. Bemerkenswert erscheint mir die Tatsache, daß die Rotfärbung der Membranen und des Cytoplasmas bis weit ins alkalische Gebiet reicht. Höfler (1946, 1949) sagt darüber: „In toten Teilen der Schnitte, wo die Zellinhalte ausgeflossen sind, erfolgt die elektroadsorptive Membranfärbung bei pH 7 bis pH 11 so stark oder meist deutlich noch stärker als im sauren Bereich.“ Eine elektroadsorptive Färbung durch Ionen wäre in diesem pH-Bereich auch theoretisch noch möglich. Nach Angaben von Zanker (1952) herrscht bei pH 10,45 zwischen Base/Ion gerade Gleichgewicht. Später nehmen Höfler und Mitarbeiter (1950) zwischen AO und Plasmasubstanzen eine chemische Verbindung an, da die Rotfärbung durch  $\text{CaCl}_2$  nicht zu verdrängen ist. Die Wand ist nach Höfler mit Plasmasubstanzen imbibiert und ergibt daher gleichfalls Rotfärbung. Nach Drawert (1937, 1956) wäre diese Art der Färbung als Niederschlagsfärbung zu bezeichnen. Auch an Moosen konnte Höfler (1947) Rotfärbung der Zellwände noch bei pH 8,5 beobachten.

Eine Rotfärbung der Nucleoli an meinem alkoholfixierten Material konnte ich nur in einem Falle bei  $\frac{1}{4}$ stündiger Anfärbung bei pH 6,0; 6,5 und 8,2 beobachten. Bukatsch und Haitinger (1940) beschreiben das gleiche Phänomen für Gefrierschnitte von Monokotylen-Wurzelspitzen und Höfler (1947) für  $\text{NH}_3$ -behandelte Oberepidermis von *Allium cepa*.

Häufig blieben die Nucleoli an meinem Material ohne Fluoreszenzfärbung. Sie waren dann als dunkle Flecken in dem hell fluoreszierenden Kern sichtbar.

Auffällig ist weiterhin, wie den Tabellen zu entnehmen ist, die Farbverschiebung nach Rot bei längerer Färbedauer. Für das alkoholfixierte Material ist also die maximale Färbung nach 15 Minuten noch nicht erreicht. Frisch angesetzte Farblösung färbt schneller als alte. Vielleicht ist diese Tatsache auf eine Verringerung des Dispersitätsgrades des Farbstoffes beim Altern zurückzuführen. Die Stabilität des AO-Kations bleibt nach jahrelangem Stehen im Dunkeln gewahrt, wie Zanker (1954) berichtet. An einer Lösung, die ich ein Jahr lang in diffusem Tageslicht in einem mit



Schliffstopfen versehenen Kolben aufbewahrte, konnte ich allerdings feststellen, daß sie merklich dunkler war als eine frische AO-Lösung gleicher Konzentration.

Bei sehr langen Färbezeiten (18 bis 23 Stunden) tritt im neutralen und alkalischen Gebiet eine tief dunkelrote, beinahe schwarze Kernfärbung auf, wenn man die Kerne im UV-Licht mit Euphosfilter betrachtet. Im Blaulicht dagegen fluoreszieren die Kerne noch ganz schwach gelbgrün. Betrachtet man diese Kerne im Hellfeld, so zeigen sie eine intensiv dunkelgelbe bis dunkelrotbraune Färbung, scheinen also den Farbstoff kräftig gespeichert zu haben. Eine endgültige Deutung dieser Erscheinung vermag ich nicht zu geben. Es wäre allerdings denkbar, daß es sich hier in den Kernen um eine Löschung der Fluoreszenz handelt. Über das Auftreten von Eigenlöschung bei AO ist mir aber nichts bekannt.

#### b) HCl-fixiertes Material

Über das Färbbild mit AO nach HCl-Fixierung gibt die Tab. 9 Auskunft. Zwischen einer Färbezeit von 15 und 45 Minuten treten keine Unterschiede in der Fluoreszenz der Zellbestandteile auf. Die Kerne färben sich zwischen pH 3,3 und 6,4, das Cytoplasma zwischen pH 4,5 und pH 9,6 stets kupferrot an. Dieser Befund stimmt mit den Angaben von Strugger

Tab. 9. AO-Färbung an HCl-fixierten Zwiebelepidermen nach einer Färbungszeit von 45 Minuten mit einer 2 Tage alten AO-Lösung. Beobachtungen im Blaulicht.

pH	Wände	Kerne	Cytoplasma
1,8	negativ	gelb	gelbgrün
2,8	"	orange	gelborange
3,3	"	kupferrot	"
3,8	"	"	rotorange
4,5	"	"	kupferrot
5,3	"	"	"
5,9	"	"	"
6,4	"	"	"
8,1	"	gelb-kupferrot, gequollen	"
9,6	"	"	"
10,6	"	gelb	orange

(1949 b) und Höfler, Todt und L u h a n (1950) recht gut überein. Allerdings erhielt Strugger im neutralen und basischen Bereich grün gefärbte Kerne, während ich die Kerne der von mir gemusterten Präparate doch als gelb bezeichnen mußte.

Ein ganz anderes Verhalten als bei Strugger wiesen die Zellwände in meinen Präparaten auf. Nach 45 oder 60 Minuten langem Anfärben zeigten sie noch keine Fluoreszenz. Es ist allerdings häufig nicht leicht zu entscheiden, ob die Wand selbst oder das ihr anhaftende Cytoplasma rot fluoresziert. Nach sorgfältigem Beobachten kam ich aber zu dem Eindruck, daß das Plasma und nicht die Wand der Träger der Fluoreszenz ist.

Dies bestätigten auch Untersuchungen im Hellfeld. Es blieben die Membranen völlig farblos. Allein die Mittellamelle färbte sich bei pH 4,6; 5,3 und 5,8, aber auch sie färbte sich nicht überall durchgehend. Auf den Mittellamellen fanden sich vielmehr gefärbte Knötchen perlschnurartig aufgereiht.

Dehnte sich die Färbezeit bis zu 15 Stunden aus, so nahm auch die Wand zwischen pH 3,8 und pH 5,9 eine fahlrote Fluoreszenzfarbe an.

Wurde das Epidermismaterial zunächst 5 Minuten in 5%iger HCl fixiert, ausgewaschen und mit 70%igem Alkohol nachfixiert und darauf 1½ Stunden in AO angefärbt, so blieben die Membranen auch farblos.

Für das Ausbleiben bzw. die langsame und geringe Färbbarkeit der Wände nach HCl-Fixierung bieten sich mehrere Erklärungsmöglichkeiten an.

1. Die AO-Färbung der Membranen könnte auf Anwesenheit von Pektinen (vgl. Kinzel 1953 und die nachfolgende Beschreibung über die Fluorochromierung von Zellstoffwatte) beruhen. Es müßte also eine weitgehende Herauslösung der Pektine durch die HCl stattgefunden haben.

2. Die HCl, die zur Fixierung verwendet wurde, könnte trotz des Auswaschens des Fixierungsmittels z. T. in der Epidermis, d. h. stärker in den Kernen und im Plasma als in der Wand, verbleiben. Bekanntlich reichert sich, wie aus Vitalfärbungsversuchen bekannt ist, der Farbstoff im Bereich höherer Azidität an (Drawert 1948, Bartels 1954).

Gegen die erstgenannte Annahme spricht, daß die Wände sich bei längerer Färbezeit doch fluorochromieren lassen. Außerdem fällt auch die Rutheniumrotfärbung an diesem Material positiv aus.

Ich neige zur zweiten der Erklärungsmöglichkeiten.

#### *c) Anfärbung von Zellstoffwatte*

Als Modellsubstanz für die Zellwände verwendete ich wie Strugger (1949), Kölbl (1947) und Kinzel (1953) Zellstoffwatte. Die Färbungsergebnisse, die ich erhielt, stimmen mit Kinzels Färbeergebnis überein. Bei keinem pH konnte ich eine kupferrote Fluoreszenz der Watte nach AO-Färbung beobachten, selbst dann nicht, wenn ich die Watte bis zu drei Tagen in der AO-Lösung beließ. Das Alter der AO-Lösung hatte auf dieses Färbeergebnis keinen Einfluß.

Bei pH 1,6 färbten sich die Wattenfasern gelb, erreichten zwischen pH 6 und 8 ein Färbungsmaximum, wobei sie orange erschienen, und waren bei pH 9,4 und 10,2 gelborange (beobachtet im Blaulicht mit Gelbfilter OG 1; 2,5 mm). Bei der benutzten Filterzusammenstellung sah die Eigenfluoreszenz der Fasern ganz ähnlich aus. Im UV-Licht (mit Euphos-Filter) zeigten die angefärbten Fasern dagegen eine intensive, blaue Fluoreszenz. Daran änderte ein unterschiedlicher pH-Wert nichts. Dagegen wiesen drei Tage mit AO bei verschiedenen pH-Werten gefärbte Fasern im UV-Licht verschiedene Gelbnuancen auf und erschienen bei pH 9,4 und 10,2 schließlich gelbgrün.

Nach Kinzel (1953) ist in den nicht inkrustierten Zellwänden das Pektin das farbstoffbindende Agens. Auch Czaja (1934) schreibt bereits, es sei bekannt, „daß die Zellulose keine Affinität zu den basischen und

sauren Farbstoffen in wässriger Lösung hat". Nach diesem Forscher beruht die Färbung der nicht inkrustierten Zellwände mit basischen Farbstoffen auf dem alkalischen Membraneffekt, vor allem der Mittellamellen. Der alkalische Membraneffekt hat wiederum seine Ursache im Vorhandensein einer unlöslichen Ca-Verbindung (aber nicht Calciumpektinat!) in den Wänden. Es könnte sich hierbei wohl um Protopektin handeln, das allerdings außer Ca-Ionen auch noch Mg- und Fe-Ionen enthalten kann und wasserunlöslich ist (vgl. Henglein 1955). Kinzel (1953) berichtet, daß Watte nach einem Oxydationsprozeß mit  $\text{NO}_2$  zu stärkerer AO-Aufnahme und damit zur Rotfluoreszenz befähigt ist. Zellstoffwatte durchläuft aber am Ende des Herstellungsganges ohnehin zumeist einen Bleichprozeß, d. h. die Fasern werden einer Oxydation durch  $\text{HOCl}$ ,  $\text{Cl}_2$  oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  ausgesetzt. Ich nehme an, daß Strügger und Kölbl stärker oxydierte Watte für ihre Versuche verwendeten, als sie Kinzel und ich benutzten.

#### d) Hitzegetötetes Material

Die Epidermen wurden hierbei 5 Minuten in kochendem Wasser fixiert.

Sowohl die Wände als auch die Kerne und das Cytoplasma färbten sich bei bestimmter cH der Farbflotte rot an, wie Tab. 10 zu entnehmen ist. Die

Tab. 10. AO-Färbung an hitzegetöteten Zwiebelepidermen nach einer Färbungszeit von 60 Minuten mit 1 Jahr bzw. 2 Tage alten AO-Lösungen. Beobachtungen im Blaulicht.

pH	Alter der Farblösung					
	1 Jahr	2 Tage	1 Jahr	2 Tage	1 Jahr	2 Tage
	Wände		Kerne		Cytoplasma	
1,7	—	gelblich	dkl.-gelb	gelb	dkl.-gelb	gelblich
2,8	—	dkl.-gelb	"	dkl.-gelb	"	dkl.-gelb
3,3	dkl.-gelb	"	"	"	"	"
3,8	kupferrot	kupferrot	gelborange	gelborange	gelborange	kupferrot
4,6	"	"	"	kupferrot	"	"
5,3	"	"	orange	"	orange	"
5,9	kupfer ?	"	"	"	"	"
6,5	negativ	"	kupferrot	"	kupferrot	"
8,2	"	kupferrot	"	"	"	"
9,7	"	?	"	"	"	"
10,7	"	?	rotorange	orange	rotorange	orange-gelb

Kerne und das Cytoplasma fluoreszierten meist in nahezu demselben Farbton. Die Wände erschienen im stark sauren Gebiet nur schwach gelblich oder gar nicht gefärbt. Im alkalischen Milieu blieb die Wandfärbung ganz aus. Häufig traten im schwach sauren und im alkalischen Milieu im Plasma intensiv rot oder gelb fluoreszierende Granula auf. Höchstwahrscheinlich handelte es sich hierbei um stark koagulierte Plasmateilchen. Wie eine Vergleichsfärbung mit Nilrot (nach Gutz 1956) zeigte, lagen diese Granula in geringerer Zahl vor, als Sphärosomen vorhanden waren, und außerdem

waren sie größer als diese. Eine Nachfärbung des Nilrotpreparates mit AO löschte die Fluoreszenz der Sphärosomen.

Wie aus der Tab. 10 zu entnehmen ist, befinden sich meine Färbegergebnisse mit denen von Strugger (1949 b) und Höfler, Toth und L u h a n (1950) in guter Übereinstimmung. Die Färbezeit (15 oder 60 Minuten) scheint bei der Hitzetötung auf das Färbbild keinen Einfluß zu haben.

#### e) Kältefixiertes Material

Die Epidermen wurden 45 bis 60 Minuten einer Temperatur von ca.  $-7^{\circ}$  ausgesetzt. Es ergab sich nach dieser Fixierungsmethode eine gute Färbbarkeit mit AO.

Tab. 11. Vergleich der AO-Färbungen nach verschiedener Fixierungsart.

pH	Wände	Kerne	Cytoplasma
Alkoholfixierung (nach langer Färbezeit)			
1,7	gelb	gelb	gelblich
↓	↓	↓	↓
10,7	kupfer	tief dunkelrot	kupferrot
HCl-Fixierung			
1,8	negativ	gelb	gelbgrün
↓	↓	↓	↓
10,6	negativ	kupferrot	kupferrot
		↓	↓
		gelb	orange
Hitzetötung			
1,7	gelblich	gelb	gelb
↓	↓	↓	↓
10,7	kupferrot	kupferrot	kupferrot
		↓	↓
		orange	orangegelb
Kältefixierung			
1,7	gelb	gelb	gelblich
↓	↓	↓	↓
	kupferrot	orange	kupferrot
	↓	↓	↓
10,6	negativ	dunkelgelb oder orange oder grün	kupferrot

Die Wände färbten sich im stark sauren Milieu gelb bis orange und von pH 3,8 bis pH 9,6 kupferrot. Bei pH 10,6 trat keine Wandfärbung mehr auf.

Das Cytoplasma färbte sich bei pH 1,7 grünlich, bei pH 2,8 gelblich und bei pH 3,3 dunkelgelb. Die Färbung ging dann bei geringerer *ch* (bis pH 9,7) über Orange in Kupferrot über. Bei pH 10,8 fluoreszierte das Cytoplasma grün.

Die Kernfärbung war bei pH 1,7 bereits gelb, erreichte bei pH 6,0 ihr Maximum mit einem Rotorange und ging bei noch geringerer cH in Gelb oder Grün über. Jedoch fiel die Kernfärbung im neutralen und alkalischen Bereich etwas wechselhaft aus.

Die Tab. 11 gibt eine kurze Übersicht über die AO-Färbungen der Zwiebelepidermis nach verschiedener Fixierung.

Aus den Tab. 7—11 dürfte hervorgehen, daß mir nach diesen Befunden eine IEP-Bestimmung der Wand, des Kernes und des Cytoplasmas nicht möglich war. Ein Übergang von Grün nach Gelb, wie ihn Höfler und Mitarb. (1950) zur IEP-Bestimmung heranziehen, trat zumeist gar nicht auf, und der Übergang von Gelb nach Rot, der nach Strugger (1949 b) und Schwantes (1952) den IEP bezeichnen soll, war so gleitend, daß ich danach teilweise zu ganz unwahrscheinlichen IEP-Werten gekommen wäre.

#### *f) Anfärbung des Gelatine-Toluol-Modells*

Da Strugger und Höfler Farbstoffpräparate anderer Herkunft (Hollborn und Söhne bzw. AO stand. „Bayer“) als ich benutzten, fragte es sich, ob diese Differenzen auf die unterschiedlichen Farbstoffe zurückzuführen seien. Das AO von Hollborn stand mir leider nicht zur Verfügung. Ich führte daher noch mit meinem Farbstoff vergleichsweise Färbungen am Gelatine-Toluol-Modell aus, das Strugger (1949 b) angibt. Außerdem prüfte ich die Dissoziation des AO von Merck bei verschiedenem pH, indem ich mit Toluol ausschüttelte.

Beobachtete man im Blaulicht mit Gelbfilter (OG 5), so durchlief die Gelatine von pH 1,7 bis 6,5 Farbnuancen zwischen dunkelgelb und kupferrot (UV-Licht, Gelbgrün bis Gelb, Rand rötlich gefärbt). Die intensivste Färbung wurde ungefähr bei pH 6,5 erreicht, wie auch Kölbl (1947) feststellte. In den pH-Stufen 8,1; 9,6 und 10,7 war die Gelatine nur fahlrot gefärbt (im UV-Licht in diesen pH-Stufen keine Fluoreszenz mehr). Das Toluol begann bei pH 5,8 gelb (im UV-Licht blaugrün) zu fluoreszieren. Die kräftigste Gelbfluoreszenz erreichte das Toluol bei pH 10,7, in meiner Versuchsreihe die Pufferlösung mit geringster cH. Im UV-Licht wechselte die blaugrüne Fluoreszenz der lipophilen Phase in ein intensives Gelbgrün über.

Eine Grünfärbung der Gelatine im stark sauren Gebiet und eine kupferrote Fluoreszenz bei geringerer cH, wie sie das Cytoplasma zumeist im schwach alkalischen Bereich zeigte, konnte ich demnach mit keiner der benutzten Filterkombinationen beobachten. Einen Umschlag der Fluoreszenzfarbe von Gelb nach Rot am IEP der Gelatine, der nach meinen vorhergehenden Versuchen zwischen pH 4 und 5 liegen muß, erhielt ich nicht.

#### *g) Ausschütteln der gepufferten AO-Lösungen mit Toluol*

Zum Vergleich schüttelte ich frisch angesetzte und ein Jahr alte AO-Lösung mit Toluol aus. Die alte Farblösung schien ganz allgemein etwas lipophiler zu sein als die frisch hergestellte Lösung. Jedoch waren die Unterschiede der Färbung zwischen frischer und alter Lösung nur geringfügig.

Schüttelte ich frische Farblösung aus, so zeigte sich die erste Fluoreszenzfärbung im Toluol bei pH 3,8, wogegen mit alter Farblösung auch unterhalb von pH 3,8 eine geringe blaugrüne Fluoreszenz bemerkbar war. Auch bei pH 10,7 wies die Toluolphase der alten Farblösung einen intensiver gelbgrünen Farbton auf als die der frischen AO-Lösung.

Die Farben der lipophilen und hydrophilen Phase wurden bei Tageslicht und im UV-Licht nach den Ostwaldschen Farbtafeln bestimmt. Die Versuchsreihe der frisch angesetzten Farblösung steht mit den Ergebnissen von Strugger in besserer Übereinstimmung als die der alten Farblösung. Leider ist die Farbdefinition nach der Ostwaldschen Farbtafel auch eine recht subjektive Methode. Ich kam daher verständlicherweise zu etwas anderen Farbwerten, als sie Strugger angibt. Die von Strugger beschriebenen Farbwerte sind im Vergleich zu meinen sowohl im UV- wie auch im Tageslicht gelber.

Nach den erhaltenen Versuchsergebnissen können die Unterschiede zwischen dem von Strugger und dem von mir benutzten Acridinorangepräparat nicht groß sein.

#### *h) Schnittrandphänomen*

Die Erscheinung des „Schnittrandphänomens“ trat am deutlichsten bei kurzen Anfärbungen (bis zu 1 Stunde) an kälte- und alkoholfixiertem Material auf, gar nicht dagegen an hitze- oder HCl-getöteten Epidermen. Das Auftreten des Schnittrandphänomens war an meinen Präparaten vor allem für die Wände deutlich. Die Kerne und das Cytoplasma der Randzellen waren dagegen nur eine Farbnuance kräftiger als die Kerne und das Cytoplasma der Mittelfeldzellen gefärbt. Die intensivere Wandfärbung reichte, wie auch Höfler (1946) beschreibt, nur  $\frac{1}{4}$  bis  $\frac{1}{2}$  Zelllänge weit hinein. Die Breite dieses intensiver gefärbten Randes war pH-abhängig. Das Schnittrandphänomen trat an meinen Präparaten ungefähr bei pH 4,5 auf und reichte bis ins alkalische Gebiet hinein. Dieser Befund steht auch mit Höflers Angaben in Übereinstimmung.

Färbte ich länger als zwei Stunden, so war eine intensivere Färbung der Wände der Randzellen nicht mehr zu bemerken. Wurde dagegen sehr lange gefärbt (über 18 Stunden), so fluoreszierten die Wände der Wundrandzellen im sauren Milieu bis pH 4,6 gar nicht, während die Wände der Zellen des Mittelfeldes gefärbt waren. Auch dieses Phänomen wurde bereits von Höfler (1946, 1947), allerdings für kürzere Färbezeiten, beschrieben.

Wie Höfler (1946) ausführt, weist die Erscheinung des Schnittrandphänomens darauf hin, daß die Bindung des AO in den Membranen viel reichlicher erfolgt, wenn das Mizellagerüst quer durchschnitten wurde, „wobei dem Farbstoff der direkte Zutritt zum submikroskopischen Kapillarsystem der Zellmembran eröffnet wird. Inwieweit daneben auch chemische Veränderungen der schnittnahen Zellwandteile mitwirken, bleibt zu klären“. Nimmt man mit Kinzel (1953) an, daß die AO-Färbung nur auf das Pektin der Zellwände anspricht, so wird das Pektin durch den Schnitt für den Farbstoff besser zugänglich und daher intensiver gefärbt sein. Es wird



das Pektin nahe den Schnittändern aber auch besser für die in den sauren Puffern enthaltene HCl zu erreichen sein und daher einem Lösungsprozeß zuerst zum Opfer fallen. Mit dieser Auslegung der Versuchsergebnisse stimmt auch die Tatsache überein, daß sowohl nach Hitzefixierung als auch nach HCl-Fixierung, also den beiden Fixierungsmethoden, die das Pektin von vornherein angreifen, auch bei kürzeren Färbezeiten kein Schnitttrandphänomen in bezug auf die Wände auftrat (vgl. Henglein 1935 über Pektine).

### Zusammenfassung

Es wurden Färbeversuche mit dem Farbstoffpaar Säurefuchsin/Methylenblau zur IEP-Bestimmung verschieden vorbehandelter Gelatine durchgeführt. Eine Verlagerung des IEP von Gelatine zum Neutralpunkt hin ist nach Vorbehandlung mit Säuren, Oxydationsmitteln und Schwermetallverbindungen zu verzeichnen. Eine Verschiebung des IEP in das stärker saure Gebiet durch Reduktionsmittel konnte nicht beobachtet werden.

Das Alter der Farblösungen Säurefuchsin/Methylenblau hat einen Einfluß auf die Lage der ermittelten IEP-Werte. Mit zunehmendem Alter der Farbstofflösungen sinkt der gefundene IEP für Gelatine weiter in das stärker saure Gebiet hinein ab.

Mit geringer werdender Farbstoffkonzentration verschiebt sich der gefundene IEP von Gelatine gleichfalls ins stärker saure Gebiet.

Es wurden weiterhin voll ausdifferenzierte, alkoholfixierte Blätter von *Helodea densa*, alkoholfixierte Stückchen der Oberepidermis der Zwiebel-schuppen von *Allium cepa* und gereinigte Gelatinefolie zur IEP-Bestimmung mit elf verschiedenen Farbstoffpaaren angefärbt. Die gefundenen IEP-Werte variieren je nach Objekt um 0,5 bis 1,5 pH-Einheiten.

Aus den Ergebnissen wird geschlossen, daß der IEP mit Farbstoffpaaren nicht exakt zu bestimmen ist. Näherungswerte vermag die Methode aber bei der Verwendung geeigneter Farbstoffpaare zu liefern. Sie ist daher, vor allem in Ermangelung einer besseren Bestimmungsmethode, nicht grundsätzlich abzulehnen. Es ist aber zu fordern, daß Berichten über IEP-Bestimmungen mit Farbstoffpaaren genaue Angaben über Art und Herkunft der Farbstoffe, Farbstoffkonzentration, Färbetemperatur, Färbezeit, Alter der Farblösungen, Pufferungsart und Fixierungsart des Gewebes beizufügen sind.

Untersuchungen an Zwiebeloberepidermis von der Basis, der Mitte und der Spitze der Schuppe zeigten, daß in bezug auf den IEP des Cytoplasmas ein Längsgradient vorhanden ist.

Die Färbbarkeit von der Zwiebeloberepidermis mit Acridinorange wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Fixierungsart der Epidermis untersucht. Nach den erhaltenen Versuchsergebnissen zu schließen, scheint eine exakte IEP-Bestimmung mit Acridinorange nicht möglich zu sein.

Es wird versucht, eine Erklärung für das „Schnitttrandphänomen“ bei der Acridinorangefärbung zu geben.

Herrn Professor Dr. H. Drawert danke ich für die Anregung zu der Arbeit.

#### Literatur

- Bartels, P., 1954: Quantitative mikrospektroskopische Untersuchung der Speichungs- und Permeabilitätsverhältnisse acridinorangegefärbter Zellen. *Planta* **44**, 341.
- Boerner-Patzelt, D., 1950: Über ursächliche Faktoren der polychromen Fluoreszenz von Geweben und Gewebestrukturen nach Fluorochromierung mit nur einem Fluorochrom. *Protoplasma* **39**, 639.
- Borriß, H., 1937: Die Abhängigkeit der Aufnahme und Speicherung basischer Farbstoffe durch Pflanzenzellen von inneren und äußeren Faktoren. *Ber. dtsch. Bot. Ges.* **55**, 584.
- Brooks, C. S., and M. Moldenhauer-Brooks, 1941: The permeability of Living Cells. *Protoplasma-Monogr.* **19**, Berlin.
- Bukatsch, F., und M. Haitinger, 1940: Beiträge zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Zellinhaltes, insbesondere des Cytoplasmas und des Zellkerns. *Protoplasma* **34**, 515.
- Czaja, A. Th., 1934: Untersuchungen über metachromatische Färbungen von Pflanzengewebe II. Basische Farbstoffe. *Planta* **21**, 531.
- Drawert, H., 1937: Das Verhalten der einzelnen Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe gegen saure und basische Farbstoffe bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration. *Flora* **132**, 91.
- 1938: Protoplasmatische Anatomie des fixierten *Helodea*-Blattes. *Protoplasma* **29**, 206.
- 1948: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle V. Zur Theorie der Aufnahme basischer Stoffe. *Z. Naturforsch.* **5b**, 111.
- 1951a: Beiträge zur Vitalfärbung pflanzlicher Zellen. *Protoplasma* **40**, 85.
- 1951b: Zur Frage der Bestimmung des isoelektrischen Punktes von lebendem Plasma. *Z. Naturforsch.* **6b**, 141.
- 1952: Die Eigenfluoreszenz der Schuppenblattepidermis von *Allium cepa* L. und ihre Beeinflussung. *Z. Bot.* **40**, 407.
- 1956: Die Aufnahme der Farbstoffe. Vitalfärbung. In W. Ruhland, *Handb. Pflanzenphysiol.* **2**, 252.
- Fautrez, J., et L. Lison, 1937: Études sur la diffusibilité des colorants. *Protoplasma* **27**, 169.
- Fischer, R., and P. La rose, 1952: Mechanism of Gram stain reversal. *J. Bacter. (Am.)* **64**, 435.
- Fisher, E. R., 1953: The destruction of cytoplasmatic basophilia with mineral acids. *Stain Techn.* **28**, 9.
- Floethmann, E., 1954: Cytologische Untersuchungen an *Azotobacter chroococcum* Beij. *Arch. Mikrobiol.* **20**, 243.
- Gicklhorn, J., 1931: Zur Diskussion der Grundlagen und Beweise der Ultrafiltertheorie der Permeabilität. *Protoplasma* **15**, 567.
- Gutz, H., 1956: Zur Analyse der Granula-Fluorochromierung mit Nilblau in den Hyphen von *Mucor racemosus* Fres. *Planta* **46**, 481.
- Härtel, O., 1951: Gerbstoffe als Ursache voller Zellsäfte. *Protoplasma* **40**, 338.
- Henglein, F. A., 1955: Pektine. In K. Paesch und M. V. Tracey: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* **2**, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Höfler, K., 1946: Über den isoelektrischen Punkt natürlicher Zellulosemembranen und deren Färbbarkeit mit Fluorochromen. *Sber. Österr. Ak. Wiss. Wien, math.-nat. Kl.* **7**, 41.

- Höfler, K., 1947: Einige Nekrosen bei Färbung mit Acridinorange. Sber. Österr. Ak. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I, 156, 585.
- A. Toth und M. Luhan, 1950: Beruht die Fluorochromfärbung von Zellkernen auf Elektroadsorption an der Eiweißphase? Protoplasma 39, 62.
- Holmes, W. C., and H. F. Snyder, 1929: The atmospheric oxydation, or dealkylation, of aqueous solutions of methylene blue. Stain Techn. 4, 7.
- Houska, H., 1939: Zur protoplasmatischen Anatomie der Küchenzwiebel. Öst. bot. Z. 88, 161.
- 1942 Beiträge zur Kenntnis der Kappenplasmolyse (Zur Ätiologie und protoplasmatischen Anatomie der Kappenplasmolyse bei *Allium cepa*). Protoplasma 36, 11.
- Kinzel, H., 1953: Die Bedeutung der Pektin- und Zellulosekomponente für die Lage des Entladungspunktes pflanzlicher Zellwände. Protoplasma 42, 209.
- Kölbel, H., 1947: Quantitative Untersuchungen über die Farbstoffspeicherung von Acridinorange in lebenden und toten Hefezellen und ihre Beziehungen zu den elektrischen Verhältnissen der Zelle. Z. Naturforsch. 2b, 382.
- Levine, N. D., 1940: The determination of apparent isoelectric points of cell structures by staining at controlled reactions. Stain Techn. 15, 91.
- Loeb, J., 1924: Die Eiweißkörper und die Theorie der kolloidalen Erscheinungen. Berlin.
- Möllendorff, W. v., 1918: Methoden zu Studien über vitale Färbungen an Tierzellen. In Abderhalden, Handbuch für biologische Arbeitsmethoden V, Tl. 2, 97.
- Nistler, A., 1931: Über die Bedeutung der Dispersoidanalyse und eine Neukonstruktion des Diffusionsmikroskops. Protoplasma 13, 517.
- Nordmeyer, N., 1948: Eine neue Methode zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes von Bakterien. Zbl. Bakter. usw. 152, 54.
- Rawlins, W. C., and C. L. Schmidt, 1929: Studies on the combinations between certain basic dyes and proteins. J. biol. Chem. (Am.) 82, 709.
- — 1930: The mode of combination between certain dyes and gelatine granules. J. biol. Chem. (Am.) 88, 271.
- Reuter, L., 1953: Protoplasmatische Pflanzenanatomie. In L. V. Heilbrunn und F. Weber, Protoplasmatologia 11/2, Wien.
- Schwantes, H. O., 1952: Färbungsanalytische Untersuchungen zur Lage des isoelektrischen Punktes der Zellbestandteile in wachsenden Zellen und Geweben I. Untersuchungen an Pilzmycelien. Protoplasma 41, 382.
- Seki, M., 1933: Zur physikalischen Chemie der histologischen Färbung IX. Über den Einfluß der Fixierung auf die Färbbarkeit der histologischen Elemente. Z. Zellforsch. usw. 18, 21.
- Singer, M., 1952: Factors which control the staining of tissue sections with acid and basic dyes. Intern. rev. cytology 1, 211.
- Stearn, A. E., 1931: Stoichiometrical relations in the reaction between dye, nucleic acid and gelatine. J. biol. Chem. (Am.) 91, 325.
- and E. W. Stearn, 1923: The mechanical behavior of dyes especially Gentian Violet in bacteriological media. J. Bacter. (Am.) 8, 567.
- — 1924a: The chemical mechanism of bacterial behavior I. Behavior toward dyes-factors controlling the Gram-reaction. J. Bacter. (Am.) 9, 463.
- — 1924b: The chemical mechanism of bacterial behavior II. A new theory of the Gram-reaction. J. Bacter. (Am.) 9, 479.
- — 1924c: The chemical mechanism of bacterial behavior III. The problem of bacteriostasis. J. Bacter. (Am.) 9, 491.

- Stearn, A. E., and E. W. Stearn, 1926: Conditions and reactions defining dye bacteriostasis. *J. Bacter. (Am.)* 11, 345.
- — 1930: Chemotherapeutic equilibria. *J. exper. Med. (Am.)* 51, 341.
- — 1931: Metathetic staining reactions with special reference to bacterial systems. *Protoplasma* 12, 435.
- Strugger, S., 1933: Über das Verhalten des pflanzlichen Zellkerns gegenüber Anilinfarbstoffen. Ein Beitrag zur Methodik der Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Kernphasen. *Planta* 18, 561.
- 1940: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Acridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. *Jena. Z. Naturw.* 73, 97.
- 1949 a: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanzen. 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- 1949 b: Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover.
- Tolstouhiov, A. V., 1928: The effect of preliminary treatment (fixing fluids) on staining properties of the tissues. *Stain Techn.* 3, 49.
- Yamaha, G., und T. Ishii, 1933: Über die Wasserstoffionenkonzentration und die isoelektrische Reaktion der pflanzlichen Protoplasten, insbesondere des Zellkerns und der Plastiden. *Protoplasma* 19, 194.
- 1936: Weitere Beiträge zur Kenntnis über den isoelektrischen Punkt pflanzlicher Protoplasten. *Sc. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku Sect. B.2*, 209.
- Zanker, V., 1952: Über den Nachweis definierter reversibler Assoziate („reversibler Polymerisate“) des Acridinorange durch Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in wäßriger Lösung. *Z. physik. Chem.* 199, 225.
- 1954: Die Tieftemperaturspektren einiger homologer sechsgliedriger N-Heterocyclen und ihre Entwicklung zu den Spektren der Acridinfarbstoffe. *Z. physik. Chem.* 2, 52.
- Zeiger, K., 1930: Der Einfluß von Fixationsmitteln auf die Färbbarkeit histologischer Elemente, Versuche mit hochdispersen Farbstoffen. *Z. Zellforsch. usw.* 10, 481.
- 1938: Physikochemische Grundlagen der histologischen Methodik. Dresden und Leipzig.
- Zeller, A., 1939: Zur chemischen Anatomie der Küchenzwiebel. *Gartenbauwiss.* 13, 66.

# **Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Cytoplasma des Aortenendothels**

Von

**D. Sinapius und W. Schreil**

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Heidelberg

(Direktor: Prof. Dr. Randerath)

und dem Gastlaboratorium der Firma Carl Zeiß, Oberkochen

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. August 1955)

Dem Endothel der Arterien und Venen als monocellulärer Grenzschicht zwischen Gefäßwand und strömendem Blut wird für die Stoffversorgung der inneren (kapillarf freien) Gefäßwandschichten durch Diffusion gelöster Bestandteile des Blutes und für die Pathogenese zahlreicher Gefäßveränderungen eine wesentliche Bedeutung zugeschrieben. Die Permeabilität des Endothels ist daher nicht nur im Zusammenhang mit der Kapillarfunktion, sondern auch im Rahmen der Physiologie und Pathologie der Gefäßwand ein wichtiges Problem. Beim Stoffdurchtritt durch die celluläre Grenzschicht kann sich das Endothel nach theoretischen Erwägungen aktiv (im Sinne der Stoffaufnahme und -verarbeitung) oder passiv als differenziert permeable Membran verhalten. Beide Möglichkeiten sind im Rahmen allgemeiner Theorien der Endothelfunktion, sei es für den Kapillarabschnitt, sei es für das gesamte Gefäßsystem, diskutiert worden.

Im Sinne der Dysorie-Lehre Schürmanns macht das Endothel durch aktive Zelltätigkeit die Blutflüssigkeit gewebsfähig, indem sie u. a. höhermolekulare Blutproteine zu niedermolekularen Substanzen abbaut. Krogh, Landis, Chambers und Zweifach, Danielli u. a. haben dem Endothel dagegen eine mehr passive Rolle zugeschrieben und als Ort des Stoffdurchtritts Poren lichtmikroskopischer Größenordnung, sogenannte Stigmata und Stomata (Landis), das gesamte Cytoplasma (Krogh) oder die sogenannte „intercelluläre Zementsubstanz“ (Chambers u. Zweifach) angenommen.

Diese Permeabilitätstheorien gehen von bestimmten Vorstellungen über die Feinstruktur des endothelialen Cytoplasmas aus. Dem morphologischen Studium des Cytoplasmas kommt daher im Hinblick auf die Endothelfunktion besondere Bedeutung zu. Das Elektronenmikroskop hat durch Entwicklung der Dünnschnitttechnik in jüngster Zeit neue Wege zur Struktur-

aufklärung des endothelialen Cytoplasmas eröffnet. Entsprechende Untersuchungen haben sich vor allem mit dem Endothel der Glomeruli beschäftigt und sind erst neuerdings auf das Kapillarendothel anderer Organe und Gewebe ausgedehnt worden (Palade). Dagegen fehlen bisher noch elektronenmikroskopische Studien über das Endothel der Arterien und Venen.

Die Feinstruktur des Cytoplasmas läßt sich am Endothel der Arterien und Venen wegen seiner außerordentlich geringen Schichtdicke lichtmikroskopisch am besten im Flächenpräparat beurteilen. Wir haben auf Grund dieser Erfahrungen mit der vorliegenden Arbeit erstmalig die Brauchbarkeit der Häutchenpräparation für elektronenmikroskopische Untersuchungen des Aortenendothels überprüft. Der präparatorisch eingeschlagene Weg hat sich, obwohl noch der Verbesserung bedürftig, als grundsätzlich gangbar erwiesen und erweitert den Anwendungsbereich des Elektronenmikroskops.

Aus der angedeuteten Problemstellung ergeben sich für unsere Untersuchungen folgende Fragen:

1. Welche Schichtdicke besitzt das Cytoplasma des Aortenendothels?
2. Welche sublichtmikroskopische Struktur ist dem undifferenzierten Cytoplasma (Hyaloplasma) eigen?
3. Welche Cytoplasmadifferenzierungen und welche Cytoplasmainschlüsse sind sublichtmikroskopisch erkennbar?
4. Wie hängen die Endothelien seitlich zusammen und welche Anhaltspunkte für die Existenz einer intercellulären „Zementsubstanz“ im Sinne von Chambers und Zweifach ergeben elektronenmikroskopische Beobachtungen?

Eine vollständige und in jeder Hinsicht befriedigende Beantwortung dieser Fragen darf durch die ersten elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Aortenendothels nicht erwartet werden. Die Interpretation elektronenmikroskopischer Beobachtungen an biologischem Material ist überdies dadurch erschwert, daß mit verschiedenartigen präparatorisch bedingten Kunstprodukten zu rechnen ist. Das Artefaktproblem spielt daher bei cytologischen Untersuchungen im sublichtmikroskopischen Bereich eine große Rolle (Wolfarth-Bottermann). Die vorliegenden Untersuchungen sollen zur Klärung der damit zusammenhängenden Fragen beitragen. Dazu war es notwendig, den lichtmikroskopischen Befund fixierten und nicht fixierten Endothels zum Vergleich heranzuziehen und die Beeinflussung des elektronenmikroskopischen Bildes durch einige der gebräuchlichsten Fixationsmethoden zu prüfen.

### Material, Methode, Technik

Der Verwendung des Elektronenmikroskops in der Cytologie stellten sich anfangs erhebliche Schwierigkeiten entgegen, da sich nur sehr dünne Objekte bis zu ca.  $0,1\mu$  durchstrahlen lassen. Erst die Entwicklung besonderer Dünnschnittmethoden hat die Herstellung der erforderlichen Objektdicke ermöglicht. Ohne Anfertigung solcher Dünnschnitte konnten bisher nur besonders dünne Einzelzellen,



eventuell kleine Zellgruppen oder Teile von Gewebekulturen elektronenmikroskopisch untersucht werden (Jakob u. Mahl, Porter).

Die lichtmikroskopisch gewonnene Erfahrung, daß das Endothel der großen Gefäße sehr dünn ist, veranlaßte uns zu prüfen, ob nicht zum mindesten das Cytoplasma des geschlossenen Endothelverbandes durchstrahlbar ist. Wir haben daher folgende bei lichtmikroskopischen Untersuchungen bereits bewährte Verfahren der Häutchenpräparation angewandt:

1. Das Celloidinverfahren.

Es knüpft an ein von Kotschetow angegebenes Verfahren an und ist von uns an anderer Stelle eingehend beschrieben (Sinapius). Die wesentlichen Punkte der Methode seien daher hier nur kurz skizziert:

- a) Aufspannen der Gefäßstücke auf Kork.
- b) Fixieren.
- c) Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe bis zum Ätheralkohol und Übergießen der Oberfläche mit 8%iger Celloidinlösung.
- d) Abziehen des festgewordenen Celloidins als geschlossenes Häutchen.
- e) Ablösen des Celloidins in Äther-Alkohol.
- f) Auffangen der Endothelhäutchen auf die üblichen mit Formvar (Formvar 1595 der Shawinigare Corporation, gelöst in Dioxan) befilmten Objektträgernetze.

2. Abschaben kleiner Stücke des fixierten Endothels von der Oberfläche mit der Objektträgerkante.

Die Gegenüberstellung dieser beiden unterschiedlichen Verfahren war für die Klärung des Artefaktproblems wichtig, weil die Celloidinmethode ohne vollständige Entwässerung nicht durchführbar ist, bei der zweiten Methode dagegen die Alkoholeinwirkung vermieden werden kann.

Das Untersuchungsmaterial umfaßt:

1. Endothelhäutchenpräparate der Schweine-Aorta.

Das Material wurde in  $\text{OsO}_4$ , Formol oder Alkohol fixiert und danach entweder im Celloidinverfahren (also mit vollständiger Entwässerung) oder durch Abschaben von der Oberfläche ohne Alkoholnachbehandlung präpariert.

Bei der oberflächlichen Lage und der sehr geringen Schichtdicke des Endothels hielten wir relativ kurze Fixationszeiten für ausreichend.

- |                                       |             |
|---------------------------------------|-------------|
| a) In 0,1%iger $\text{OsO}_4$ -Lösung | 1 Minute    |
| b) Über $\text{OsO}_4$ -Dämpfen       | 1—2 Minuten |
| c) In 10%igem Formol                  | 1 Minute    |

Die von uns gewählte Fixationsdauer in  $\text{OsO}_4$  entspricht den Angaben von Romeis (für Einzelzellen und Ausstriche). Ähnlich kurze Zeiten hat auch Mann für ausreichend erachtet.

Nach der Fixation in  $\text{OsO}_4$  wurden die Präparate 3 Stunden in Ringerlösung gespült und dann auf die befilmten Objektträgerplättchen aufgezogen. Wir haben die üblichen Bronzenetzobjektträgerplättchen benutzt, die etwa 50 Netzmaschen von je  $2500 \mu^2$  aufweisen.

Ein Teil der Präparate wurde nach den Angaben von Palade in einer isotonischen  $\text{OsO}_4$ -Lösung vom pH 7,2—7,5 fixiert und anschließend gleichfalls für 3 Stunden mit Tyrodelösung nachbehandelt.

Wird die Fixierung des Endothels wesentlich über die oben angegebenen Zeiten hinaus ausgedehnt, dann lassen sich im allgemeinen infolge einer sehr festen „Vernetzung“ des Endothels mit dem subendothelialen Gewebe keine geeigneten Häutchenpräparate mehr abziehen.

2. Endothelpräparate der *V. jugularis externa* vom Kaninchen (Celloidin-häutchenmethode).

5. Endothelpräparate von 27 menschlichen Aorten, die ausschließlich in Alkohol fixiert und danach mit dem Celloidinverfahren, also unter völliger Entwässerung, präpariert wurden. Das Material wurde den laufenden Sektionsfällen entnommen und stammt überwiegend von Individuen des höheren Lebensalters. Als Kontrollfälle dienten Endothelpräparate von vier jüngeren Personen im Alter zwischen 31 und 42 Jahren.

## Beobachtungen

### I. Allgemeine Beobachtungen

Beide Präparationsmethoden (die Celloidinmethode und das Abschaben fixierter Endothelhäutchen) haben für unsere Untersuchungen eine Reihe brauchbarer Endothelpräparate ergeben, deren Cytoplasma elektronenmikroskopisch gut zu durchstrahlen war. Beim Aufbringen der Endothelhäutchen auf die Netzobjektträger läßt es sich nicht immer vermeiden, daß sich das Endothel faltet oder zusammenschiebt. Solche Präparate scheiden für die Untersuchung der Cytoplasma-Feinstruktur aus. Durch lichtmikroskopische Vorkontrolle ist es nach einiger Übung ohne weiteres möglich, die für die Elektronenmikroskopie verwertbaren Präparate auszuwählen.

Für das Cytoplasma gut ausgebreiteter und gut durchstrahlbarer Endothelhäutchen (Abb. 3–10) kann eine Schichtdicke von 20–80 m $\mu$  angenommen werden.

Endothelkerne lassen sich in manchen Fällen ebenfalls (wenigstens teilweise) durchstrahlen. Abb. 3 zeigt einen solchen in der Fläche ovalen, sehr dünnen Endothelkern von der *V. jugularis externa* eines Kaninchens. Die den Kern überlagernde dünne Cytoplasmaschicht ist gut zu erkennen.

Während der elektronenmikroskopischen Beobachtung pflegen nur dickere, eventuell gefaltete oder zusammengesobene Stellen des Cytoplasmas aufzureißen. Gut durchstrahlbare Partien bleiben dagegen während der Beobachtungszeit bei mittlerer Intensität unverändert.

### II. Lichtmikroskopische Beobachtungen am Endothel der Schweine-Aorta

#### 1. Das Phasenkontrastpräparat

Abb. 1 zeigt ein abgeschabtes und in Ringerlösung unter dem Phasenkontrastmikroskop untersuchtes Endothelhäutchen bei 1000facher Vergrößerung. Die ovalen Kerne liegen, wie es für die Schweine-Aorta typisch ist, relativ dicht und lassen 2–4 Kernkörperchen erkennen. Das Cytoplasma erscheint teilweise homogen, an anderer Stelle etwas körnig und ist in der Umgebung mancher Kerne dichter als in der Peripherie. Bemerkenswert ist die große Anzahl runder Aufhellungen verschiedener Größe sowohl in der unmittelbaren Umgebung der Endothelkerne als auch im peripheren Cytoplasma. Die Größe dieser Aufhellungen, die hier als Vakuolen bezeichnet werden sollen, variiert beträchtlich. Die größten erreichen in ihrem Durchmesser fast die halbe Länge kleinerer Kerne, etwa 5  $\mu$ . Der Durchmesser der kleinsten Vakuolen liegt an der Grenze des lichtmikroskopischen Auflösungsvermögens, etwa bei 0,2  $\mu$ .

## 2. Präparate nach Fixation und Färbung

Abb. 2 zeigt das Bild eines Endothelhäutchens, das nach  $\text{OsO}_4$ -Fixation (0,1%ige Lösung 1 Minute) oder Formolfixation (1 Minute in 10%iger Lö-

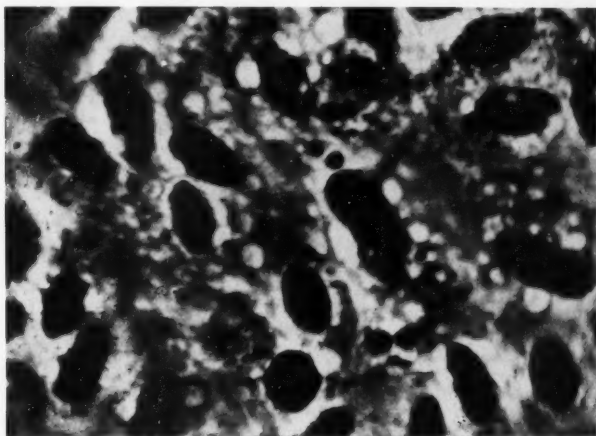


Abb. 1. Endothel Schweine-Aorta. Schabpräparat in Ringerlösung. Phasenkontrast. 850fach. Vakuolen im Cytoplasma.

sung) in Heidenhainschem Eisenhämatoxylin gefärbt wurde. Auch an diesem Präparat enthält das Cytoplasma eine große Zahl runder Aufhellungen

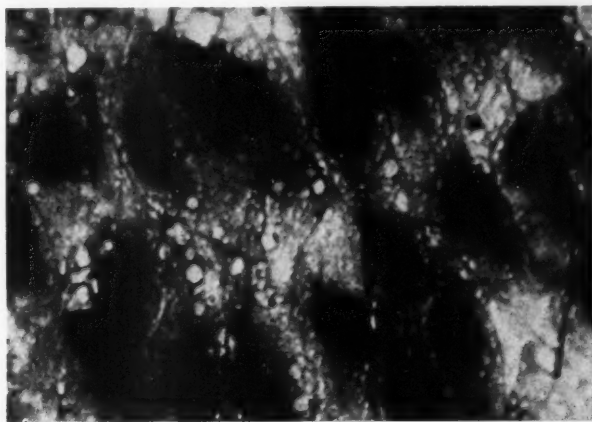


Abb. 2. Endothel Schweine-Aorta. Fixierung  $\text{OsO}_4$  0,1% 1 Min. Eisenhämatoxylin. 1000fach. Vakuolen und perinukleäre Verdichtungen im Cytoplasma.

(Vakuolen), die in ihrer Größe und Lage den im Phasenkontrastpräparat beobachteten Vakuolen entsprechen. Sie sind vielfach von einem intensiver

gefärbten Randsaum umgeben. Im perinukleären Bereich ist das Cytoplasma deutlich stärker angefärbt (verdichtet). Man sieht außerdem teils zwischen den Kernen, teils ungeordnet innerhalb des übrigen Cytoplasmas Linien, die ein unvollständiges mosaikähnliches System bilden.

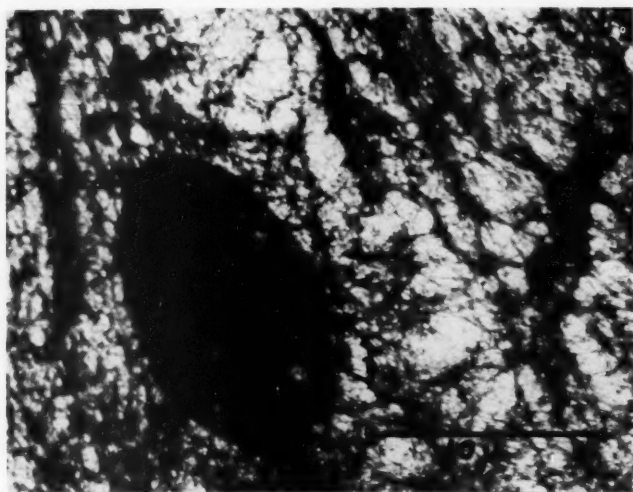


Abb. 3. Endothel *V. jug. ext.* Kaninchen. Celloidinhäutchen. Elektronenbild 3750fach. Durchstrahlbarer Kern, netzige Cytoplasmastruktur (Fixationsartefakt).

Um über die Natur der Vakuolen Aufschluß zu gewinnen, wurde eine Anzahl von Präparaten mit Sudanschwarz auf Lipoide und mit Bestschem Carmin auf Glykogen gefärbt. Beide Färbungen fielen negativ aus. Weder die Vakuolen noch andere Teile des Cytoplasmas lassen sich mit den genannten Färbemethoden anfärben.

### III. Elektronenmikroskopische Beobachtungen am Endothel der Schweine-Aorta

1. An abgeschabten Häutchen nach kurzer Fixation über  $\text{OsO}_4$ -Dämpfen oder in 0,1%iger  $\text{OsO}_4$ -Lösung oder in 10%igem Formol.

Abb. 4 zeigt die Grundstruktur des Cytoplasmas nach Fixation über  $\text{OsO}_4$ -Dämpfen (2 Minuten) bei 12.500facher Vergrößerung. In der rechten unteren Ecke des Bildausschnittes ist eben der Rand eines Endothelkernes zu sehen. Das Cytoplasma weist zahlreiche teils scharf, teils unscharf begrenzte runde Aufhellungen auf, die wechselnd gut durchstrahlbar, aber optisch nicht völlig leer sind. Die geringste Massendicke besitzen die größeren Aufhellungen, während die kleineren in der Regel weniger gut durchstrahlbar sind. Der Durchmesser dieser Aufhellungen liegt zwischen 50 und 500 m $\mu$ . Das übrige Cytoplasma kann um die Aufhellungen einen dichteren Rand-

saum bilden. Man sieht außerdem rundliche oder unregelmäßig gestaltete Verdichtungen ohne scharfe Begrenzungen. An anderen Präparaten lassen sich auch strangförmige, ebenfalls unscharf begrenzte Verdichtungen beobachten. Häufig ist das Cytoplasma auch in der Umgebung des Kerns verdichtet.

Innerhalb des wechselnd stark aufgehellten oder verdichteten Cytoplasmas lassen sich keine distinkten Partikel sublichtmikroskopischer Größenordnung erkennen.

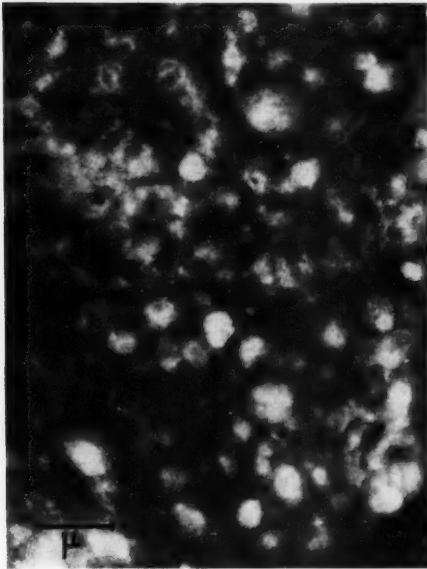


Abb. 4

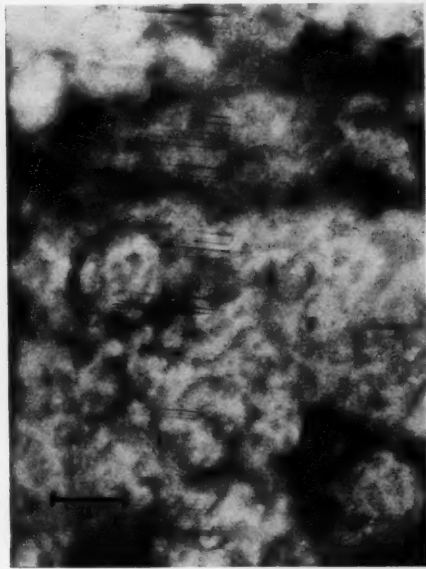


Abb. 5.

Abb. 4. Endothel Schweine-Aorta. Fixierung  $\text{OsO}_4$ -Dämpfe 2 Min. Schabpräparat. Elektronenbild 12.500fach. Vakuolige Aufhellungen im sonst homogenen Hyaloplasma.

Abb. 5. Endothel Schweine-Aorta. Fixierung Formol 10% 1 Min. Schabpräparat. Elektronenbild 12.500fach.

Abb. 5 zeigt nach kurzer Formolfixation des Endothelhäutchens ein ganz ähnliches Bild des endothelialen Cytoplasmas. Die Zahl der Aufhellungen ist hier wesentlich geringer, ihr Durchmesser aber größer. In der unteren Bildhälfte ist eine von einem dunkleren Randsaum umgebene Aufhellung von etwa  $1\mu$  Durchmesser zu sehen. Das übrige Cytoplasma ist zum Teil strangförmig, zum Teil mit runder unscharfer Begrenzung verdichtet. Die feinsten Aufhellungen des cytoplasmatischen Zusammenhangs liegen auch hier in der Größenordnung von etwa  $50\text{ m}\mu$ .

2. An Celloidinhäutchenpräparaten ( $\text{OsO}_4$ - und Formolfixation mit nachfolgender Alkoholeinwirkung oder Alkoholfixation).

Alle mit Alkohol behandelten Präparate zeichnen sich durch eine besondere Cytoplasmastruktur aus, und zwar unabhängig davon, ob der Alkoholeinwirkung eine kurze Fixation in  $\text{OsO}_4$  oder Formol vorausgegangen ist.

Abb. 6 und 7 zeigen den Grundtyp des in Alkohol fixierten oder mit Alkohol nachbehandelten Cytoplasmas. Man sieht ein grobes Netzwerk,

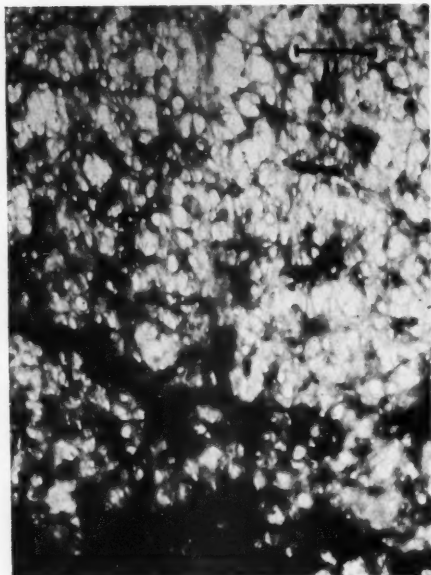


Abb. 6.

Abb. 6. Endothel Schweine-Aorta. Fixierung Formol 10% 1 Min. Celloidinhäutchen (Alkohol-Nachbehandlung!). Elektronenbild 12.500fach. Netzige Cytoplasmastruktur, perinukleäre Verdichtungen.



Abb. 7.

Abb. 7. Endothel Schweine-Aorta. Alkoholfixierung. Celloidinhäutchen. Elektronenbild 12.500fach. Grobnetzige Cytoplasmastruktur, undurchstrahlbare perinukleäre Cytoplasmaverdichtungen.

dessen Maschen rund oder rundoval sind. Die Größe der Maschen liegt zwischen 50 und 500  $\text{m}\mu$  und entspricht damit etwa den oben beschriebenen Vakuolen. Fast immer findet sich das Cytoplasma perinukleär erheblich verdichtet und ist dort z. T. völlig undurchstrahlbar. Abb. 6 und 7 zeigen deutlich, daß das cytoplasmatische „Retikulum“ im peripheren Anteil besser durchstrahlbar ist als im perinukleären Bereich. Der Durchmesser der Maschen nimmt gewöhnlich nach der Peripherie zu. Außer der perinukleären Verdichtungszone sieht man häufig auch unregelmäßig strangförmige, manchmal verzweigte cytoplasmatische Verdichtungen.



Schließlich finden sich innerhalb des cytoplasmatischen „Retikulums“ rundliche oder längliche, oft scharf begrenzte Verdichtungen, die als distinkte Teilchen imponieren. Sie sind, wie Abb. 6 zeigt, meist völlig undurchstrahlbar.

#### IV. Elektronenmikroskopische Beobachtungen am Aortenendothel des Menschen

Die Endothelhäutchen menschlicher Aorten wurden aus äußeren Gründen ausschließlich in Alkohol fixiert und mit der Celloidinmethode präpariert. Dabei ergab sich die gleiche netzige Grundstruktur des Cytoplasmas, wie sie oben für das in Alkohol fixierte oder mit Alkohol nachbehandelte Endothel der Schweine-Aorta beschrieben wurde. Um Wiederholungen zu vermeiden, sollen daher hier nur diejenigen Besonderheiten angeführt werden, durch die sich manche Endothelhäutchenpräparate der menschlichen Aorta auszeichnen.

1. An den Endothelpräparaten von 23 menschlichen Aorten waren lichtmikroskopisch staubförmige, fein- oder grobschollige Cytoplasmaeinschlüsse meist in vielkernigen, seltener in einkernigen Endothelien nachzuweisen, die sich mit Hämatoxylin gut anfärben lassen und mit basischen Anilinfarben (Toluidinblau, Thionin, Kresylviolett) eine orthochromatische Farbreaktion geben.

Diese Einschlüsse im endothelialen Cytoplasma lassen sich auch elektronenmikroskopisch ausgezeichnet als distinkte Teilchen darstellen, da sie völlig undurchstrahlbar, also außerordentlich dicht und in der Regel scharf vom übrigen Cytoplasma abgegrenzt sind. Abb. 8 zeigt vorwiegend runde oder ovale, seltener polymorphe Einschlüsse. Elektronenmikroskopisch lassen sich auch kleinste Einschlüsse mit einem Durchmesser von ca. 100 m $\mu$  beobachten.

2. Eine zweite Besonderheit der Cytoplasmastruktur einiger Präparate von zwei menschlichen Aorten zeigen Abb. 9 und 10, und zwar ein zusammenhängendes System fädiger oder strangförmiger Cytoplasmaver-

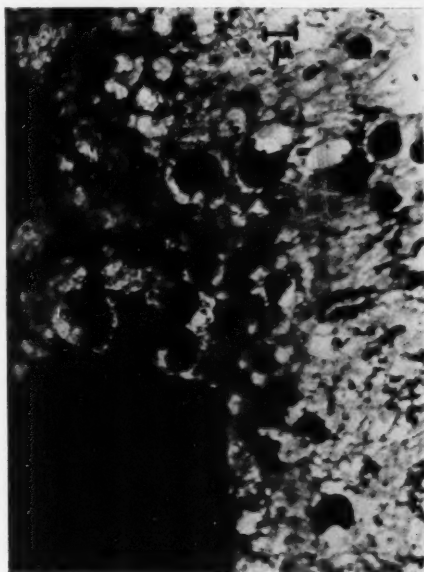


Abb. 8. Aortenendothel, 71jähriger Mann. Alkoholfixierung, Celloidinhäutchen. Elektronenbild 5550fach. Cytoplasmaeinschlüsse.

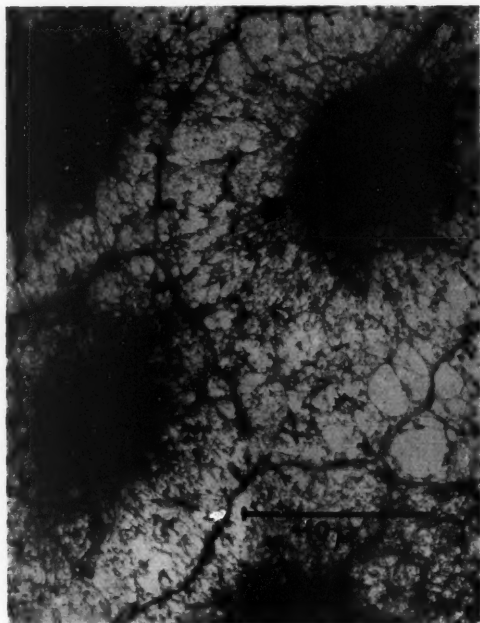


Abb. 9. Aortenendothel, 71jähriger Mann. Alkoholfixierung. Celloidinhäutchen. Elektronenbild 3000fach.

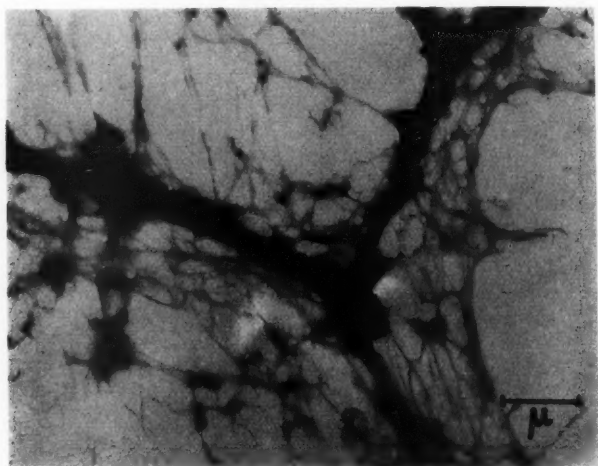


Abb. 10. Aortenendothel, 71jähriger Mann. Alkoholfixierung. Celloidinhäutchen. Elektronenbild 12.500fach. Strangförmige periphere Cytoplasmaverdichtungen.

dichtungen, deren maximale Breite  $0,2-0,5 \mu$  beträgt. Stärkere Vergrößerungen lassen erkennen, daß sie durch feine Stränge und Fäden in das umgebende Cytoplasma kontinuierlich übergehen oder sich in mehrere feinere Cytoplasmastränge aufteilen (Abb. 10). Stellenweise sind die peripheren Cytoplasmaverdichtungen auch durch kleine Lücken unterbrochen. Abb. 9 zeigt, daß sie dicht an den Kernen vorbeiführen können.

## Beurteilung und Diskussion

### 1. Die Schichtdicke des Endothels

Die Permeabilität des Gefäßendothels ist u. a. auch von seiner Schichtdicke (Höhe) abhängig. Das Schrifttum enthält hierüber, abgesehen von allgemeinen Feststellungen über die platte, kubische oder zylindrische Form der Endothelien, nur vereinzelt genauere Angaben. Nach Krogh soll z. B. das Kapillarendothel eine Höhe von  $0,8 \mu$  besitzen. Die aus unseren elektronenmikroskopischen Beobachtungen erschlossene Schichtdicke des endothelialen Cytoplasmas (Schweine-Aorta) kann jedoch noch erheblich geringer sein und etwa den zehnten Teil des von Krogh angegebenen Wertes betragen. Weitere Untersuchungen werden zeigen müssen, in welcher Größenordnung die Schichtdicke des Endothels variieren kann und welche Verhältnisse für die Kapillarendothelien gelten.

Angaben über „kubische“ und „zylindrische“ Endothelien sind mit großer Kritik zu beurteilen, da (wie bereits früher betont) an Schnittpräparaten der Gefäßwand gekippte und daher in Wirklichkeit flach aufliegende Endothelien solche Formen vortäuschen können.

### 2. Der lichtmikroskopische Befund

Benninghoff beschreibt den Zelleib ausgereifter Kapillarendothelien als „scheinbar homogen und durchsichtig“. Das Cytoplasma soll um den Kern angehäuft bzw. verdichtet sein, nach den Rändern dünner werden und in der Kernumgebung eine feinkörnige Verdichtung erkennen lassen (Benninghoff, Efskind, Seelkunow). Rouget hat an Kapillarendothelien perinukleär ein feinschaumiges Cytoplasma, Benninghoff am Endothel kleiner Venen vakuolenähnliche Aufhellungen beschrieben. Ferrara hat am endothelialen Cytoplasma eine leichte Basophilie und fädige Strukturen, Zimmermann an Endothelien kleiner Nierenvenen der Katze netzförmige Cytoplasmaverdichtungen festgestellt.

Nach eigenen lichtmikroskopischen Untersuchungen ist auch das Cytoplasma des Rinder-Aortenendothels in der Kernumgebung verdichtet und enthält häufig zahlreiche Vakuolen. Vakuolen konnten auch an nicht fixierten Endothelien der Rinder-Aorta im Phasenkontrastpräparat beobachtet werden (Sinapius).

Perinukleäre Verdichtungen sind auch am endothelialen Cytoplasma der Schweine-Aorta ein konstanter Befund und vakuolige Aufhellungen des Cytoplasmas können örtlich in großen Mengen und verschiedener Größe auftreten (Abb. 1 und 2). Da solche Vakuolen auch im sublichtmikroskopischen Größenbereich zu beobachten sind (Abb. 4 und 5), verdienen sie unsere besondere Beobachtung.

Vakuolen sind nach allgemein-pathologischen Vorstellungen Ausdruck einer Störung des Wasserhaushaltes der Zelle, bei der das Wasser infolge Über-

sättigung oder durch Herabsetzung seiner Bindung an die Polypeptide des Cytoplasmas in Tropfenform lichtmikroskopisch sichtbar wird (Büchner). Vakuolen in diesem Sinne sind an zahlreichen Parenchymzellen, z. B. der Leber, der Niere und am Herzmuskel, bekannt und durch chemische Einwirkung auch im Tierversuch erzeugt worden (Büchner, Altmann, Kettler).

Cytoplasmavakuolen durch Bildung von Wassertropfchen können aber auch als reversible Zustandsänderungen am lebenden Plasma durch chemische Einwirkungen oder mechanische Reizung entstehen (sogenannte „vitale Entmischungsvorgänge“ Zeiger) oder durch den Fixationsvorgang hervorgerufen werden.

Neuerdings berichten Palade und Rinehart über elektronenmikroskopische Beobachtungen feinsten Bläschen im Cytoplasma von Kapillarendothelien, die mit dem Flüssigkeitsdurchtritt durch das Endothel zusammenhängen sollen (Palade).

Die von uns bis in den sublichtmikroskopischen Größenbereich beobachteten Cytoplasmavakuolen stellen sicher keinen Fixationsartefakt dar, da sie auch an unfixierten Präparaten zu sehen sind. Dagegen läßt sich vorerst nicht sicher entscheiden, ob die Vakuolen durch den Präparationseingriff (mechanische Ablösung von der Gefäßwand, Verbringen in eine isotonische Lösung) hervorgerufen werden. Bevor diese Frage nicht eindeutig geklärt ist, erscheint es uns zwecklos, die eventuelle Bedeutung der Vakuolen für Permeabilität und Stoffwechsel des Endothels zu diskutieren.

### 3. Zum Artefaktproblem in der Elektronenmikroskopie

Bei unseren Untersuchungen sind (abgesehen von Strukturänderungen während der Beobachtung im Elektronenmikroskop) Eintrocknungsartefakte (infolge Lufttrocknung der Präparate auf den Objektträgerplättchen) und Fixationsartefakte denkbar.

Eintrocknungsartefakte als retikuläre, fibrilläre und granuläre Strukturen, wie sie Wolfarth-Bottermann bei seinen Modellversuchen zum Artefaktproblem festgestellt hat, sind bei der von uns gewählten Präparationsmethode offenbar nicht aufgetreten. Von größerer Bedeutung für die Beurteilung elektronenmikroskopischer Bilder ist die Frage der Fixationsartefakte.

Nach grundlegenden Untersuchungen von Bretschneider haben sich  $\text{OsO}_4$  und Formol, schwach eiweißfällende Substanzen, als die besten Fixationsmittel für elektronenmikroskopische Präparationen erwiesen. Die Überlegenheit der  $\text{OsO}_4$ -Fixation für die Elektronenmikroskopie ist inzwischen allgemein anerkannt (Sjöstrand, Palade, Porter). Sie beruht darauf, daß  $\text{OsO}_4$  von allen bekannten Fixationsmitteln die geringste eiweißfällende Wirkung besitzt, keine nennenswerte Schrumpfung des Materials bewirkt, die Fettstoffe und Lipide weitgehend stabilisiert (Zeiger) und daher das Strukturbild der Zelle am lebensähnlichsten erhält. Nach den Erfahrungen von Bretschneider, Porter u. a. soll Formol als ebenfalls wenig eiweißfällendes Fixationsmittel dem  $\text{OsO}_4$  zum mindesten bei bestimmten Objekten nur wenig nachstehen. Alle anderen Fixationsmittel wurden von Bretschneider als bedeutend ungünstiger befunden. Die durch Dehydratation und Eiweißfällung zu starker Schrumpfung und Strukturvergrößerungen führende Wirkung des Alkohols wird besonders betont.

Wir können auf Grund unserer Erfahrungen bestätigen, daß sich  $\text{OsO}_4$ - und Formolfixation für die elektronenmikroskopische Untersuchung des

Endothels gut eignen, da sie offenbar keine nennenswerten Strukturvergrößerungen hervorrufen.  $\text{OsO}_4$  und Formol haben sich an unserem Material als gleich brauchbar erwiesen.

Dagegen wird die Cytoplasmastruktur durch Alkoholeinwirkung tiefgreifend verändert. Dehydratation und Eiweißfällung rufen eine „retikuläre“ Struktur und eine erhebliche Verdichtung des Cytoplasmas in der perinukleären Zone hervor, und zwar auch dann, wenn zuvor kurz in Formol oder  $\text{OsO}_4$  fixiert wurde. Damit werden die alten Angaben Apáthys und A. Fischers bestätigt, daß keine Fixation beendet ist, ehe das Objekt in 96%igen Alkohol gebracht wurde.

Palade hat neuerdings die Anwendung einer isotonischen  $\text{OsO}_4$ -Lösung vom pH 7,2–7,5 empfohlen und glaubt damit eine Reihe von Artefakten (u. a. auch „Vakuolen“) vermeiden zu können, wenn die Nachbehandlung mit Tyrodelösung erfolgt. Diese Mitteilung steht im Widerspruch zu älteren Schrifttumsangaben (Berg, v. Tellyesniczky u. a.), nach denen die Verwendung isotonischer Fixationsmittel zwecklos sei. Werner hat vor einer Überschätzung der H-Ionenkonzentration im Fixationsmittel gewarnt.

Wir konnten uns nicht davon überzeugen, daß die von Palade angegebene Fixationsmethode in isotonischer  $\text{OsO}_4$ -Lösung vom pH 7,2 anders wirkt als die bisher übliche nichtisotonische Lösung. Die Angaben Palades bedürfen unseres Erachtens weiterer Nachprüfung.

#### 4. Das Hyaloplasma des Endothels im Elektronenmikroskop

Der im Hell- und Dunkelfeld optisch leer erscheinende Hauptanteil des Cytoplasmas wird bekanntlich auch als Hyaloplasma bezeichnet. Über die Struktur des Hyaloplasmas existiert eine Reihe von Theorien, die einen Grundtyp der Cytoplasmastruktur pflanzlicher und tierischer Zellen annehmen. Wolfarth-Bottermann hat sich mit diesen Theorien in jüngster Zeit kritisch auseinandergesetzt. Er gelangt dabei zu dem Ergebnis, daß die angeblichen Ultrastrukturen im Sinne der Biosomentheorie Lehmanns, der Chromidienlehre Monnés und der Leptonentheorie Bretschneiders zum größten Teil Präparationsartefakte darstellen und daß das undifferenzierte Protoplasma im sublichtmikroskopischen Bereich keine geordneten Strukturen erkennen läßt, die als charakteristisch für den lebenden Zustand gelten können.

Granuläre, filamentöse, fibrilläre und retikuläre Strukturen (etwa im Sinne eines gleichmäßigen „Leptonengitters“ mit einem Maschendurchmesser von 350–600 Å nach Bretschneider) konnten wir bei 12.500-facher Vergrößerung der in  $\text{OsO}_4$  fixierten Präparate nicht feststellen. Unsere Beobachtungen sind daher geeignet, die Meinung Wolfarth-Bottermanns zu bekräftigen, nach der das Cytoplasma (Hyaloplasma) im sublichtmikroskopischen Größenbereich keine geordneten Strukturen erkennen läßt.

#### 5. Das Problem cytoplasmatischer Poren

Poren lichtmikroskopischer Größenordnung wurden u. a. zuerst von Cohnheim, später von Arnold und Kolossova angenommen und bilden die Grund-

lage zur Permeabilitätstheorie von Landis. Die Annahme solcher Bildungen stützte sich auf den Befund bei der Frischversilberung, die in manchen Fällen an den Kreuzungsstellen der Silberlinien scharf begrenzte, nach eigenen Erfahrungen bis zu  $10\mu$  im Durchmesser messende sogenannte „Stigmata“ und „Stomata“ erkennen läßt. Die Existenz solcher präformierter Öffnungen des cytoplasmatischen Zusammenhangs ist von verschiedenen Seiten bezweifelt oder verneint worden (Benninghoff, Sinapius, Linzbach, Subbotin).

Durch unsere elektronenmikroskopischen Beobachtungen läßt sich nunmehr bestätigen, daß konstante Lücken lichtmikroskopischer Größenordnung am Endothel im Regelfall nicht existieren. Bei den erwähnten „Stigmata“ und „Stomata“ dürfte es sich um Kunstprodukte handeln, die mit echten Öffnungen nichts zu tun haben.

Krogh und Danielli haben angenommen, daß sich der Stoffdurchtritt durch das Endothel nicht auf dem Wege präformierter Öffnungen mikroskopischer Größenordnung im Sinne der „Stigmata und Stomata“, sondern durch das gesamte Cytoplasma vollzieht. Da nun das Endothel nicht nur für Wasser und Elektrolyte, sondern unter Umständen auch für Kolloide (Makromoleküle) durchlässig ist, erhebt sich die Frage nach eventuellen Poren sublichtmikroskopischer Größenordnung.

Auch solche Poren konnten bei unseren elektronenmikroskopischen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.

Dabei sind aber folgende Schwierigkeiten zu bedenken:

1. Die Darstellbarkeit sublichtmikroskopischer Poren im Zusammenhang des Cytoplasmas hängt entscheidend von ihrem Durchmesser im Verhältnis zur Schichtdicke des Präparates ab. Nehmen wir bei unseren Präparaten z. B. eine Schichtdicke von  $500\text{ \AA}$  an, dann wären Poren von etwa  $50\text{--}100\text{ \AA}$  nur dann festzustellen, wenn sie als starre Röhren einen annähernd senkrechten Durchblick gestatten. Die Existenz eines solchen „Röhrensystems“ ist aber bei der außerordentlichen Verformbarkeit des Cytoplasma-Gels von vornherein unwahrscheinlich. Bei jedem Abweichen vom senkrechten Verlauf könnten aber eventuelle Poren der erwähnten Größenordnung nicht mehr optisch leer in Erscheinung treten.

2. Die Größe cytoplasmatischer Poren kann sich unterhalb der Grenze des elektronenmikroskopischen Auflösungsvermögens für gewisse biologische Objekte bewegen und dann auch bei geringster Schichtdicke nicht mehr zu erfassen sein.

3. Es ist zu bedenken, daß sich der Dehnungsgrad des elastisch verformbaren Cytoplasmas im Leben mit jeder systolischen Dehnung der Aorta periodisch ändert, die untersuchten Endothelhäutchen sich dagegen im Zustand postmortaler Retraktion befinden.

Aus dem fehlenden Nachweis sublichtmikroskopischer Poren des Cytoplasmas bei unseren Untersuchungen darf also nicht geschlossen werden, daß solche Poren nicht existieren oder in einem bestimmten Funktionszustand des Gefäßes auftreten können.

## 6. Zur Frage des „endoplasmatischen Retikulums“

Innerhalb des Hyaloplasmas vieler Zellen sind zuerst nach Fixierung und Färbung neuerdings auch elektronenmikroskopisch besondere Strukturen als Netzwerk, Körner, Fäden oder Lamellen dargestellt worden, die wegen ihrer vermutlichen Bedeutung für den Stoffwechsel dieser Zellen auch als „Ergastoplasma“ bezeichnet



werden. Porter beschreibt an Zellen aus Gewebekulturen, neuerdings auch an Dünnschnitten ein „endoplasmatisches Retikulum“, das sich im gefärbten Präparat lichtmikroskopisch durch Basophilie (Chromophilie) und cytochemisch durch einen hohen Gehalt an Ribonukleinsäuren auszeichnen soll. Porter hat das endoplasmatische Retikulum auch an Endothelien in der Gewebekultur gesehen, gibt aber nicht an, ob er damit tatsächlich Gefäßendothelien meint, und verschweigt auch, daß Endothelien in der Gewebekultur nach bisherigen Erfahrungen regelmäßig zu Fibroblasten auswachsen. Mit verlängerter Fixationsdauer in  $\text{OsO}_4$  soll das endoplasmatische Retikulum immer deutlicher hervortreten. Porter erklärt diese Erscheinung durch die Annahme, daß durch längere  $\text{OsO}_4$ -Fixation ein Teil der Proteine des Cytoplasmas abgebaut und mit der nachfolgenden Spülung (Tyrodelösung) extrahiert werde. Damit soll der stabilere Anteil des Cytoplasmas, nämlich das „endoplasmatische Retikulum“, gleichsam als Skelett deutlicher hervortreten. Nach neuesten Untersuchungen von Bahr läßt sich die Extraktion eines Teiles organischer Substanz nach  $\text{OsO}_4$ -Fixation und Spülung (teilweise bis zu 60% des Trockengewichts!) demonstrieren.

Die von uns beobachteten perinukleären Verdichtungen des Cytoplasmas können wohl den endoplasmatischen Strukturen Porters gegenübergestellt werden. Sie zeigen aber nur nach Alkoholeinwirkung eine dem „endoplasmatischen Retikulum“ ähnliche Netzform, die wir als Artefakt durch Dehydration und Schrumpfung auffassen mußten.

Wir können daher die Möglichkeit, daß das „endoplasmatische Retikulum“ auf einer ähnlichen fixationsbedingten Artefaktbildung beruht, nicht von der Hand weisen.

Ob sich ein „endoplasmatisches Retikulum“ im Sinne Porters auch am Aortenendothel nach längerer  $\text{OsO}_4$ -Fixation durch abgestufte Extraktion von Teilen des Cytoplasmas darstellen läßt, bleibt zu untersuchen. Wir haben bei unserer Präparation bewußt jede Überfixation vermieden. Nach Mann und Romeis ist für die Fixation dünner Zellverbände (Ausstriche usw.) eine Zeit von  $\frac{1}{2}$ –1 Minute in  $\text{OsO}_4$  ausreichend — eine Erfahrung, die wir bestätigen können. Wenn man mit Porter Einzelzellen der Gewebekultur 10 Minuten über  $\text{OsO}_4$ -Dämpfen fixiert und diese Zeit bis zu 24 Stunden steigert, dann bedeutet dies tatsächlich eine erhebliche Überfixation.

## 7. Zur Frage der Mitochondrien

Ob die Zellen höherer Tiere regelmäßig Mitochondrien enthalten, ist noch nicht mit Sicherheit entschieden (Gersch). An den Blutgefäßendothelien hat Efskind Mitochondrien beschrieben, ohne sie jedoch mikrophotographisch überzeugend wiederzugeben. Mitochondrien als fadenförmige Gebilde verschiedener Länge hat in jüngster Zeit auch Porter an Endothelien in der Gewebekultur beschrieben. Da aber für die Gewebekultur besondere Verhältnisse gelten, lassen sich seine Beobachtungen zum mindesten nur unter Vorbehalt zum Vergleich heranziehen. Dagegen sind an den Kapillarendothelien von Skelettmuskeln des Herzens, des Darms und des Pankreas neuerdings von Palade Mitochondrien elektronenmikroskopisch nachgewiesen worden.

Es ist uns am Aortenendothel bisher weder licht- noch elektronenmikroskopisch gelungen, konstante Gebilde bestimmter Form und Größe dar-

zustellen, die als Mitochondrien bezeichnet werden könnten. Da Mitochondrien jedoch nach allen bisherigen Erfahrungen außerordentlich labil und formveränderlich sind, können wir aus diesen Feststellungen noch keine endgültigen Schlüsse ziehen. Die Suche nach Mitochondrien wird fortgesetzt.

### 8. Sonstige Cytoplasmaeinschlüsse

Die einzigen bisher eindeutig nachgewiesenen endothelialen Cytoplasmaeinschlüsse sind am Aortenendothel des Menschen im mittleren und höheren Lebensalter bekannt (Linzbach, Sinapius, Hort). Hort hält die vorwiegend in mehr- oder großkernigen Aortenendothelien auftretenden Einschlüsse für neutrale Glykoproteide, deren Genese nach wie vor unklar ist. Eigene systematische Untersuchungen über Charakter und Entstehung dieser Einschlüsse sind noch nicht abgeschlossen.

Die Cytoplasmaeinschlüsse des menschlichen Aortenendothels lassen sich als völlig undurchstrahlbar auch elektronenmikroskopisch ausgezeichnet darstellen — und zwar teilweise auch im sublichtmikroskopischen Größenbereich. Irgendwelche Beziehungen der Einschlüsse zu präformierten Zellorganellen (etwa zu Mitochondrien) konnten naturgemäß nicht nachgewiesen werden, da der sichere Nachweis von Mitochondrien am Aortenendothel bisher noch fehlt.

### 9. Zur Frage der Zellgrenzen

Als „Zellgrenzen“ des Endothels sind zu unterscheiden:

- a) Die Grenzschicht (Plasmahaut?, Phasengrenze?) des Cytoplasmas nach dem strömenden Blut hin,
- b) die Grenzschicht zwischen Endothel und subendotheliales Gewebe,
- c) eventuelle Grenzstrukturen im seitlichen Zusammenhang des geschlossenen Endothelverbandes.

Die obere und die untere Grenzschicht des endothelialen Cytoplasmas lassen sich elektronenmikroskopisch nicht erfassen und sollen daher hier außer Betracht bleiben.

Der seitliche Zusammenhang des Blutgefäßendothels innerhalb des geschlossenen Verbandes ist ein im Schrifttum viel diskutiertes Problem und bis heute nicht befriedigend geklärt. Die Abgrenzung einzelner Zellen innerhalb dieses Verbandes ging von der Beobachtung aus, daß sich durch die sogenannte Frischversilberung (Einwirkung schwacher Silbernitratlösung auf frisches, nicht fixiertes Material) ein feines Liniennetz darstellen läßt. Diese Linien werden seither mit den sogenannten „Zellgrenzen“ identifiziert, ohne daß über Charakter und Bedeutung solcher „Zellgrenzen“ im geschlossenen Verband Klarheit geschaffen werden konnte.

V. Recklinghausen hat entsprechend dem Silberlinienbefund eine „Kittsubstanz“ zwischen den einzelnen Endothelien postuliert, die nach Arnold durch einen flüssigen oder zähweichen, auf jeden Fall nicht sehr dichten Aggregatzustand ausgezeichnet sein soll. Chambers und Zweifach gründen ihre Permeabilitätstheorie auf die Annahme, daß sich der Stoffdurchtritt durch die „intercelluläre Zementsubstanz“ des Endothels vollzieht.

Die Hell-Dunkel-Verteilung des elektronenmikroskopischen Bildes hängt von der wechselnden Dichte und Schichtdicke des Objektes ab. Kittsubstanzen oder intercellulärer Zement im Sinne von Arnold oder Cham-

bers und Zweifach müßten sich daher elektronenmikroskopisch nachweisen lassen, wenn sie sich durch ihre geringere Massendicke auf Grund einer besonderen stofflichen Zusammensetzung signifikant vom übrigen Cytoplasma unterscheiden. Unsere elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Aortenendothels haben eine solche Substanz nicht feststellen lassen. Wir halten es daher in Übereinstimmung mit Linzbach und Subbotin für unwahrscheinlich, daß eine Kittsubstanz (Zementsubstanz) am Gefäßendothel überhaupt existiert.

Auch andere Grenzstrukturen im seitlichen Zusammenhang des Endothels, etwa im Sinne einer Zellmembran oder einer Plasmahaut als Äquivalent der „Silberlinien“, ließen sich elektronenmikroskopisch an  $\text{OsO}_4$ - und formolfixierten Präparaten nicht feststellen. Das bedeutet nicht, daß solche Strukturen fehlen müssen, sondern besagt nur, daß sie sich (wenn sie wirklich vorhanden sein sollten) durch ihre Dichte nicht wesentlich vom übrigen Cytoplasma unterscheiden.

Periphere Cytoplasmaverdichtungen, die nach ihrer Lage und Anordnung seitlichen Grenzstrukturen des Endothels entsprechen könnten, haben wir nur an den Präparaten von zwei menschlichen Aorten beobachtet, die in Alkohol fixiert und daher stark dehydratisiert und geschrumpft waren. Die beobachteten Cytoplasmaverdichtungen sind also möglicherweise Fixationsartefakte. Da wir vom gleichen Material leider keine in  $\text{OsO}_4$  oder Formol fixierten Vergleichspräparate zur Verfügung hatten, können wir hierüber nicht sicher entscheiden. Wir finden vorerst auch keine Erklärung dafür, daß die Verdichtungen an keinem der in Alkohol fixierten Präparate tierischen Aortenendothels zu sehen waren.

### Zusammenfassung

1. Die Cytoplasmastruktur des Aortenendothels des Menschen, von Schweinen und Kaninchen wurde an Häutchenpräparaten elektronenmikroskopisch untersucht. Das Cytoplasma erwies sich dabei in vielen Fällen als so dünn, daß es sich elektronenmikroskopisch gut durchstrahlen ließ (Schichtdicke 20–80  $\text{m}\mu$ ). In einzelnen Fällen waren auch die Endothelkerne durchstrahlbar.

2. Nach  $\text{OsO}_4$ - und Formolfixation läßt das Cytoplasma elektronenmikroskopisch zahlreiche rundliche Aufhellungen von 50  $\text{m}\mu$  bis 1  $\mu$  Durchmesser erkennen, die als Vakuolen (Wassertröpfchen) aufgefaßt werden. Die Vakuolen sind keine Fixationsartefakte, da sie sich lichtmikroskopisch auch am unfixierten Präparat beobachten lassen.

3. Durch jede Alkoholeinwirkung wird die Cytoplasmastruktur unabhängig von vorangegangener Fixation in  $\text{OsO}_4$  oder Formol infolge Dehydratation und Eiweißfällung tiefgreifend verändert und „retikulär“ umgewandelt.

4. Nach  $\text{OsO}_4$ - und Formolfixation läßt das Hyaloplasma im sublichtmikroskopischen Bereich keine geordneten Strukturen und keine Poren licht- oder sublichtmikroskopischer Größenordnung erkennen.

5. Ein endoplasmatisches Retikulum im Sinne Porters ließ sich nach  $\text{OsO}_4$ - und Formolfixation elektronenmikroskopisch nicht nachweisen.

6. Mitochondrien konnten mit der von uns angewandten Präparation vorerst nicht nachgewiesen werden.

7. Am Aortenendothel des Menschen lassen sich die lichtmikroskopisch beobachteten Cytoplasmaeinschlüsse auch elektronenmikroskopisch, teilweise in sublichtmikroskopischer Größenordnung, gut darstellen.

8. Die Untersuchungen haben keinen Anhalt für die Existenz einer intercellulären Kittsubstanz im Sinne von Chambers und Zweifach ergeben. Auch andere Grenzstrukturen zwischen den Zellen konnten nach  $\text{OsO}_4$ - und Formolfixation nicht nachgewiesen werden.

9. Das Ergebnis unserer Untersuchungen spricht dafür, daß die Stoffversorgung der inneren Gefäßwandschichten weder durch Poren lichtmikroskopischer Größenordnung noch durch eine intercelluläre Kittsubstanz, sondern durch das gesamte Cytoplasma im Sinne Kroghs erfolgt.

Herrn Dipl.-Ing. F. Schleich danken wir für seine Unterstützung und Hilfe bei der Anfertigung der Mikrophotogramme.

Sämtliche Aufnahmen wurden mit dem AEG-Zeiß-Gerät EM 8/II gemacht.

#### Literatur

- Altmann, H. W., 1944: Über das Auftreten von Vakuolen, Einslußkörperchen und hyalinen Tropfen in den Leberzellen bei experimentellem Sauerstoffmangel. *Verh. dtsch. Pathologen* 1944, 60.
- Arnold, J., 1876: Über die Kittsubstanz der Endothelien. *Virchows Arch.* 66, 77.
- Apáthy, S. v., zit. nach Romeis.
- Bahr, G. F., 1954: Zur Kenntnis der Reaktionen der Tetroxyde des Osmiums und Rutheniums mit biologisch wichtigen Substanzen. *Naturwiss.* 41, 187.
- 1955: Zur Interpretation elektronenmikroskopischer Bilder osmiumfixierter Objekte. *Naturwiss.* 42, 121.
- Benninghoff, A., 1930: Blutgefäße und Herz. Im Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. 6, Teil 1. Berlin.
- Berg, W., 1903: Beiträge zur Theorie der Fixation mit besonderer Berücksichtigung des Zellkernes und seiner Eiweißkörper. *Arch. mikrosk. Anat.* 62, 367.
- Bretschneider, L. H., 1950: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Pflanzenzellen. *Proc. Amsterdam* 53, 1476.
- 1952: The fine structure of protoplasm. *Survey Biol. Progr.* 2, 223.
- Büchner, F., 1950: Allgemeine Pathologie. München-Berlin.
- Chambers, R., and B. W. Zweifach, 1947: Intercellular cement and capillary permeability. *Physiol. Rev.* 27, 436.
- Cohnheim, J., 1867: Über Entzündung und Eiterung. *Virchows Arch.* 40, 1.
- Danielli, J. F., and A. Stock, 1944: The structure and permeability of blood capillaries. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 19, 81.
- Efskind, L., 1940: Die Regenerationsverhältnisse im Intimaepithel nach Gefäßsuture. *Acta chir. scand.* 84, 283.
- Fischer, A., 1899: Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. Jena.
- Hort, W., 1955: Untersuchungen an den Granula der großen Einslußendothelien der Aorta. *Virchows Arch.* 326, 362.
- Jakob, A., und H. Mahl, 1941: Einige neuere Aufnahmen mit dem Übermikroskop. *Handbuch der AEG-Forschung*, Bd. 8, 64.

- Kettler, L. H., 1954: Parenchymschädigungen der Leber. *Erg. Path.* 37, 1.
- Kolossow, A., 1893: Über die Struktur des Pleuroperitoneal- und Gefäßepithels (Endothels). *Arch. mikrosk. Anat.* 42, 318.
- Krogh, A., 1922: *The Anatomy and Physiology of Capillaries*. Yale University press, New Haven.
- Landis, E. M., 1937: The passage of fluid through the capillary wall. *Amer. J. med. Sci.* 193, 297.
- Lehmann, F. E., 1952: *Mikroskopische und submikroskopische Bauelemente der Zelle*. Berlin.
- Linzbach, A. J., 1952: Vergleichende phasenmikroskopische Untersuchungen am Deckepithel der Leberkapsel und am Aortenendothel. *Z. Zellforsch.* 37, 554.
- Mann, G., 1893: A new fixing fluid for animal Tissues. *Anat. Anz.* 8, 441.
- Monné, L., 1946: Struktur und Funktionszusammenhang des Zytoplasmas. *Experientia* 2, 153.
- Palade, G. E., 1952: Fixation for electron microscopy. *Anat. Rec.* 112, 459.
- 1953: Fine Structure of Blood capillaries. *J. Appl. Physics* 24, 1424.
- Porter, K. R., 1953: Observations on a submicroscopic basophilic component of cytoplasm. *J. exper. Med. (Am.)* 97, 727.
- 1954: Electron microscopy of basophilic components of cytoplasm. *J. Histochem. a. Cytochem.* 2, 346.
- Recklinghausen, F. v., 1860: Eine Methode, mikroskopisch hohle und solide Gebilde voneinander zu unterscheiden. *Virchows Arch.* 19, 451.
- Romeis, B., 1948: *Mikroskopische Technik*. 15. Aufl. München.
- Rouget, Ch., zit. nach Benninghoff.
- Seelkunow, S., 1937: Beiträge zur Frage des Baues der Blutgefäße unter normalen und experimentellen Bedingungen. V. Über die Intima der Aortenwand der Katze. *Z. Anat.* 106, 20.
- Schürmann, P., und H. E. MacMahon, 1933: Die maligne Nephrosklerose, zugleich ein Beitrag zur Frage der Bedeutung der Blutgewebsschranke. *Virchows Arch.* 291, 47.
- Sinapius, D., 1952: Über das Aortenendothel. *Virchows Arch.* 322, 662.
- Sjöstrand, F. S., 1953: Die routinemäßige Herstellung von ultradünnen (ca. 200 Å) Gewebeschnitten für elektronenmikroskopische Untersuchungen der Gewebezellen bei hoher Auflösung. Vortrag Tagg. dtsh. Ges. Elektronenmikroskopie. Innsbruck.
- Subbotin, M. Ja., 1952: Über die Zellgrenzen des Meso- und Endothels. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, N. S. 86, 1159.
- Tellyesniczky, K. v., 1926: Artikel „Fixation“. In *Enzyklopädie der mikroskopischen Technik*. 3. Aufl. Bd. II, 750. Berlin-Wien.
- Werner, Cl., 1956: Die histologische Fixation des Innenohres. II. Teil. *Z. Hals- usw. Hk.* 41, 15.
- Wolfarth-Bottermann, K. E., 1954: Cytologische Studien I. Protoplasma 43, 347.
- Zeiger, K., 1938: *Physikochemische Grundlagen der histologischen Methodik*. Dresden und Leipzig.
- Zimmermann, K. W., 1923: Der feinere Bau der Blutkapillaren. *Z. Anat.* 68, 29.

## Referat

**Metzner, Ingeborg: Zur Chemie und zum submikroskopischen Aufbau der Zellwände, Scheiden und Gallerten von Cyanophyceen.** Archiv f. Mikrobiologie 22 (1955), S. 45—77.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit aus dem Institut von Drawert liegen auf elektronenmikroskopischem Gebiet. Es ließ sich nachweisen, daß die Scheiden vieler Cyanophyceen einen fibrillären Bau besitzen. Die Dimensionen der Fibrillen entsprechen der Größenordnung nach etwa den Zellulosemikrofibrillen der Zellwände der höheren Pflanzen.

Die eigentliche Zellmembran jedoch zeigte niemals eine solche Struktur. (Sollten etwa hier die Makromoleküle nicht gebündelt sein?) Dagegen ließen sich in den Zellwänden mehrerer untersuchter Arten erstmalig Poren nachweisen. Zwar suchten schon frühere Autoren bei *Oscillatoria* nach einem — im Zusammenhang mit dem Bewegungsvermögen postulierten — Porenapparat und glaubten ihn z. T. auch gefunden zu haben. Die Ergebnisse der referierten Arbeit machen es aber wahrscheinlich, daß damals optische Täuschungen vorgelegen haben. Die gefundenen Poren liegen nämlich in einer Größenordnung, die dem Lichtmikroskop nicht mehr zugänglich ist (7—20 m $\mu$ ). Solche Poren ließen sich (in zerstreuter Anordnung) in den Querwänden von *Scytonema*-, *Oscillatoria*-, *Lyngbya*-, und *Tolythrix*-Arten nachweisen. Ob durch diese Poren Plasmodesmen verlaufen, bleibt ungewiß, da die Poren nur nach bestimmter chemischer Vorbehandlung der Membranen sichtbar werden und daher im nativen Zustand vielleicht durch Inkrusten verengt oder verlegt sind.

Besonders interessant ist die Feststellung, daß bei *Oscillatoria*-Arten (und nur bei diesen) die Längsmembran einen eigenartigen Porenapparat besitzt: Zu beiden Seiten des Querwandansatzes und zu diesem parallel verlaufend ist nämlich die Längswand durch eine geschlossene Reihe von feinen Poren (7 m $\mu$ ) durchbrochen. Es ist sehr wohl möglich, daß damit ein wesentlicher Ansatzpunkt für die Aufklärung des Bewegungsvermögens der *Oscillatorien* gefunden ist.

Manche der wiedergegebenen Bilder machen eine Zweischichtigkeit der Zellmembran wahrscheinlich, wobei die innere Schicht plasmatischer Natur sein könnte. Verf. glaubt annehmen zu dürfen, daß die Membran imstande sei, als Ultrafilter zu wirken. Vielleicht lassen sich so auch die eigenartigen Permeabilitätseigenschaften dieser Algen bis zu einem gewissen Grade verständlich machen.

H. Kinzel, Wien.



**Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:**

<b>Politis, J.:</b> Über die Tanninoplasten oder Gerbstoffbildner der Rosaceen . . .	6. 9. 1955
<b>Kaho, H.:</b> Untersuchungen über die antagonistische Wirkung der Zucker und mehrwertigen Alkohole bei der Wirkung von Alkalien auf das Pflanzenplasma . . .	21. 11. 1955
<b>Weinmann, W. D.:</b> Untersuchungen über die Protein- und Nukleinsäurefraktionen des Zellkernes . . .	21. 11. 1955
<b>Freytag, K.:</b> Optik und Feinbau der Schleimzellen in den Knollen verschiedener <i>Orchis</i> -Arten . . .	14. 12. 1955
<b>Kaja, H.:</b> Untersuchungen über Struktur und Entwicklung der Leukoplasten in der Epidermis von <i>Chlorophytum comosum</i> (Thunb.) Bak. . .	10. 1. 1956
<b>Wiercinski, F. J.:</b> The Microinjection of Adenosine Triphosphate into the Protoplasm of Skeletal Muscle Fibers . . .	18. 1. 1956
<b>Wartenberg, A.:</b> Über Kataphoreseversuche mit Hefezellen. I. Die Wanderungsrichtung in der Kataphorese . . .	4. 3. 1956
<b>Wartenberg, A.:</b> Über Kataphoreseversuche mit Hefezellen. II. Die Wanderungsgeschwindigkeit in der Kataphorese . . .	4. 3. 1956
<b>Günther, Elisabeth:</b> Der Einfluß chemischer und physikalischer Faktoren auf die protoplasmatischen Eigenschaften isolierter <i>Elodea</i> -Blätter unter besonderer Berücksichtigung der Zusammenhänge zwischen Wachstumsphase und Plasmaviskosität . . .	7. 3. 1956
<b>Erdmann, K.:</b> Zusammenhänge zwischen reduzierenden Eigenschaften und Schutzwirkung von SH-Verbindungen gegen Strahlen . . .	10. 3. 1956
<b>Miličić, D.:</b> Virus-Zelleinschlüsse in <i>Alliaria officinalis</i> . . .	22. 3. 1956
<b>Umrath, K.:</b> Elektrische Messungen und Reizversuche an <i>Amoeba proteus</i> . . .	30. 3. 1956
<b>Drawert, H., und Ingeborg Metzner:</b> Untersuchungen zur vitalen Fluorochromierung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot . . .	3. 4. 1956
<b>Jarosch, R.:</b> Die Impulsrichtungsänderungen bei der Induktion der Protoplasmaströmung . . .	3. 4. 1956
<b>Jarosch, R.:</b> Ablösung von Zellwandbestandteilen bei schnell wachsenden <i>Nitella</i> -Internodialzellen . . .	3. 4. 1956
<b>Butterfass, Th.:</b> Modellversuche zur Beeinflussung der Diffusion eines Fluorochroms als Anzeiger des Wasserwegs in pflanzlichen Kapillaren . . .	9. 4. 1956
<b>Butterfass, Th.:</b> Fluoroskopische Untersuchungen an Keulenhaaren von <i>Vicia faba</i> L. und <i>Phaseolus coccineus</i> L. . .	9. 4. 1956
<b>Schlepp, W.:</b> Beiträge zur Physiologie der Pigmentbildung in belichteten etiolierten Blättern . . .	9. 4. 1956
<b>Mudrack, K.:</b> Über Größen- und Strukturänderungen der Chloroplasten in Rohrzucker- und Elektrolytlösungen . . .	9. 4. 1956
<b>Eschrich, W.:</b> Kallöse. (Ein kritischer Sammelbericht). . .	24. 4. 1956
<b>Bělehrádek, J.:</b> A Unified Theory of Cellular Rate Processes Based Upon an Analysis of Temperature Action . . .	3. 5. 1956
<b>Weiss, Gertrude:</b> Über Schollen- und Kristallaggregatbildung im extraplasmatischen Raum vitalgefärbter Zellen . . .	4. 5. 1956
<b>Kamiya, N., H. Nakajima und Sh. Abe:</b> Physiology of the Motive Force of Protoplasmic Streaming . . .	16. 5. 1956
<b>Koshimizu, Y., and N. Jizuka:</b> Origins and Formation of Intracellular Inclusions Associated with two Leguminous Virus Diseases . . .	16. 5. 1956
<b>Stålfelt, M. G.:</b> The Influence of Distilled Water on the Fluidity of Protoplasm . . .	18. 5. 1956
<b>Weber, F.:</b> Trichome an Crown-Galls von <i>Nicotiana</i> . . .	22. 5. 1956
<b>Parker, J.:</b> Seasonal Changes in Some Chemical and Physical Properties of Living Cells of <i>Pinus ponderosa</i> and their Relation to Freezing Resistance . . .	8. 6. 1956
<b>Erdmann, K., Ingeborg Meyer und S. Junghans:</b> Versuche zur Verhinderung von Ultraviolett-Wirkungen auf den Inhalt überlebender tierischer Zellkerne mit Strahlen-Schutzstoffen . . .	18. 6. 1956
<b>Höfler, K.:</b> Mikrosomen und Meiosomen . . .	16. 7. 1956
<b>Miličić, D.:</b> Vitalfärbungsversuche mit reduziertem Neutralrot an „vollen“ Zellsäften einiger höheren Pflanzen . . .	16. 7. 1956
<b>Reiter, Liselotte:</b> Vitale Fluorochromierung pflanzlicher Virus-Einschlußkörper . . .	16. 7. 1956

Fortsetzung auf der IV. Umschlagseite

Fortsetzung von der III. Umschlagseite

<b>Pirson, A., und G. Schaefer:</b> Osmotischer Wasserentzug und Plasmolyse mit Polyäthylenoxyd . . . . .	24. 7. 1956
<b>Werckmeister, P.:</b> Über einen eigenartigen Körper aus dem Trub von Bohnenauszugswasser . . . . .	6. 8. 1956
<b>Politis, J.:</b> Untersuchungen über die cytologische Bildung der Phytomelane bei einigen <i>Zinnia</i> -Arten . . . . .	14. 8. 1956
<b>Strugger, S.:</b> Der elektronenmikroskopische Nachweis von Plasmodesmen mit Hilfe der Uranylimprägnierung an Wurzelmeristemen . . . . .	14. 8. 1956
<b>Thaler, Irmtraud, und F. Weber:</b> Vakuolenkontraktion in <i>Pinguicula</i> -Drüsenzellen . . . . .	30. 8. 1956

SPRINGER-VERLAG IN WIEN I

## Archiv für die gesamte Virusforschung

Begründet von R. Doerr

Unter Mitwirkung hervorragender in- und ausländischer Fachleute herausgegeben von

**C. Hallauer, Bern / K. F. Meyer, San Francisco / E. G. Nauck**

**Band VI, 5. (Schluß-) Heft.** (Abgeschlossen im Dezember 1955.) Mit 55 Abbildungen.  
103 Seiten. 1956. S 138.—, DM 23.—, sfr. 23.60, \$ 5.50

**Inhaltsverzeichnis:**

**Ruska, H., D. C. Stuart, Jr., and J. Winsser.** Electron Microscopic Visualization of Intranuclear Virus-Like Bodies in Epithelial Cells Infected with Poliomyelitis Virus. **Buckley, S. M.** Visualization of Poliomyelitis Virus by Fluorescent Antibody. **Gard, S., T. Wesslén, A. Fagraeus, A. Svedmyr and G. Olin.** The use of Guinea Pigs in Tests for Immunogenic Capacity of Poliomyelitis Virus Preparations. **Lycke, E.** Cultivation of the Coxsackie Virus Subgroup B in Cultures of Human Embryonic Tissues. **Wesslén, T., and K. Lindholm.** A Comparison of the Immunity to Poliomyelitis in a Postepidemic and a Neighbouring Non-epidemic District in Sweden. **Wesslén, T., and Judith Jansson.** The Production of Smallpox Vaccine in Tissue Culture of Bovine Embryonic Skin. **Mayr, A.** Experimentelle Arbeiten über das hämagglutinierende Prinzip bei den Tierpockenviren. **Krieg, A.** „Endogene Viruserstehung“ und Latenzproblem bei Insektenviren.

## Österreichische Botanische Zeitschrift

Herausgegeben von **Lothar Geitler, Wien**

**103. Band, Heft 2-3.** (Ausgegeben im Juli 1956.) Mit 80 Abbildungen. 204 Seiten. 1956.  
S 312.—, DM 52.—, sfr. 53.20, \$ 12.40

**Inhaltsverzeichnis:**

**L. Geitler und Elisabeth Tschermak-Woess.** Neue Beobachtungen über *Torulopsidopsis*. — **D. Hartl.** Morphologische Studien am Pistill der Scrophulariaceen. **Irmtraud Thaler.** „Schlafbewegung“ der Trichterblättchen von *Trifolium pratense*. **W. Leinfellner.** Die blattartig flachen Staubblätter und ihre gestaltlichen Beziehungen zum Bauplan des Angiospermen-Staubblattes. **Friederike Wawrik.** Neue Planktonorganismen aus Waldviertler Fischteichen. **L. F. Santavý.** Substanzen der Herbstzeitlose und ihre Derivate XLV. Verbreitung der Colchicinalkaloide im Pflanzenreich. **L. Geitler.** Zur Fortpflanzungsbiologie, Embryologie und mechanistischen Deutung der Embryogenese von *Epipogium aphyllum*. **L. Friedmann.** Über die Blaualge *Gardnerula corymbosa* (HARVEY) J. DE TONI und ihr Vorkommen im Mittelmeer. **L. Geitler.** *Ocellularia carotinea* n. sp., und *O. pseudocutissima* n. sp., zwei Arten mit lokalisierter Karotinoidbildung. **W. Leinfellner.** Die Gefäßbündelversorgung des *Lilium*-Staubblattes. **F. Buxbaum.** Das Gesetz der Verkürzung der vegetativen Phase in der Familie der *Cactaceae*. **F. Schlichtinger.** Vermutliche Eiweißkörper in den Plastiden von *Gibbaea heathii*. **D. Miličić.** Eiweißkristalloide in *Opuntia inermis*. *Besprechungen.*

Zu beziehen durch jede Buchhandlung

